

日本国特許庁
PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

PCT/JP 99/02683

EV

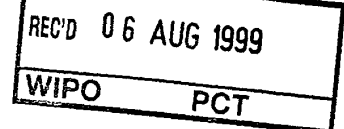
18.06.99

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日
Date of Application:

1998年 5月22日



出願番号
Application Number:

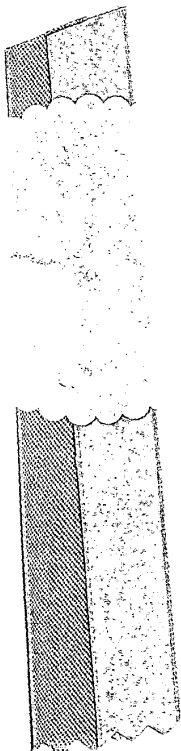
平成10年特許願第141952号

出願人
Applicant(s):

科学技術振興事業団

PRIORITY
DOCUMENT

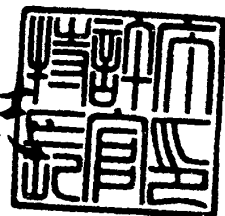
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)



1999年 7月 8日

特許庁長官
Commissioner,
Patent Office

伴佐山 建志



出証番号 出証特平11-3048126

【書類名】 特許願

【整理番号】 NP97468

【特記事項】 特許法第36条の2第1項の規定による特許出願

【提出日】 平成10年 5月22日

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 C12N 15/00

【発明の名称】 遺伝子トラッピング用ベクターとこのベクターを用いた
遺伝子トラッピング方法

【請求項の数】 19

【発明者】

【住所又は居所】 東京都町田市成瀬台2-30-13
ファインビレッジ成瀬台B102号

【氏名】 ルカチョビッチ タマッシュ

【発明者】

【住所又は居所】 東京都町田市成瀬台3-16-21

【氏名】 アスタロッシュ ソルダン

【発明者】

【住所又は居所】 東京都町田市成瀬台4-18-8

【氏名】 山元 大輔

【発明者】

【住所又は居所】 神奈川県相模原市南台3-10-12
ファミリー102

【氏名】 栗野 若枝

【特許出願人】

【識別番号】 396020800

【氏名又は名称】 科学技術振興事業団

【代理人】

【識別番号】 100093230

【弁理士】

【氏名又は名称】 西澤 利夫

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 009911

【納付金額】 35,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 外国語明細書 1

【物件名】 外国語図面 1

【物件名】 外国語要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 外国語明細書

Title of Invention

A Vector for Gene Trap, and A Method for Gene Trapping
by Using The Vector

Claims

1. A vector for trapping an unknown gene of *Drosophila melanogaster*, which is a recombinant plasmid comprising the following nucleotide sequences in this order:
an artificial consensus splicing acceptor site;
a synthetic "stop/start" sequence;
a reporter gene;
a drug resistance gene;
a gene responsible for a detectable phenotype of the *Drosophila melanogaster*; and
a synthetic splicing donor site.
2. The vector of claim 1, wherein the recombinant plasmid is derived from pCasper3.
3. The vector of claim 1 or 2, wherein the reporter gene is the Gal4 gene.
4. The vector of claim 3, which has the nucleotide sequence of SEQ ID No. 1.
5. The vector of claim 1 or 2, wherein the reporter gene is Gal4 DNA binding domain-P53 fusion gene.

6. The vector of claim 1 or 2, wherein the reporter gene is the Gal4-firefly luciferase fusion gene.

7. The vector of any one of claims 1-6, wherein the gene responsible for a detectable phenotype of the *Drosophila melanogaster* is mini-white gene.

8. The vector of any one of claims 1-7, wherein the drug resistance gene is neomycin-phosphotransferase gene and its promoter is a heatshock promoter.

9 A vector derived from pCasperhs, which has the heatshock promoter directed Gal4 activator domain-large T antigen fusion gene within polycloning site of the pCasperhs.

10. A method for trapping an unknown gene of a *Drosophila melanogaster* by using a vector which is a recombinant plasmid comprising the following nucleotide sequences in this order:

an artificial consensus splicing acceptor site;

a synthetic "stop/start" sequence;

a reporter gene;

a drug resistance gene;

a gene responsible for a detectable phenotype of the *Drosophila melanogaster*; and

a synthetic splicing donor site,

which method comprises the steps of:

(a) introducing the vector into the genome of a white minus fly;

(b) selecting primary transformants resistant to a drug;

- (c) crossing the primary transformants with a transposase source strain to force the vector to jump into other locations;
 - (d) selecting secondary transformants by picking up the flies having strong eye color,
 - (e) crossing the secondary transformants with UAS (Upstream Activator Sequence)-luciferase harboring strain and measuring the reporter gene expression of the resultant flies; and
 - (f) identifying the trapped gene by cloning and sequencing the cDNAs fused to the reporter gene and the gene responsible for a detectable phenotype of the fly.
11. The method according to claim 10, wherein the recombinant plasmid is derived from pCasper3.
12. The method according to claim 10 or 11, wherein the reporter gene in the vector is the Gal4 gene, and in the step (e) the Gal4 expression is measured.
13. The method according to claim 10 or 11, wherein the reporter gene of the vector is the Gal4-firefly luciferase fusion gene, and in the step (e) expression of said fusion gene is measured without crossing the secondary transformants with UAS-luciferase harboring strain.
14. The method according to any one of claims 10 to 14, wherein the gene responsible for a detectable phenotype of the *Drosophila melanogaster* is mini-white gene, and in the step (f) the cDNAs fused to the reporter gene and the mini-white gene are cloned and sequenced.

15. The method according to any one of claims 10 to 15, wherein the drug resistance gene is neomycin-phosphotransferase gene and its promoter is a heatshock promoter, and in the step (b) the transformants resistant to G418 is selected.

16. A method for trapping an unknown gene of a *Drosophila melanogaster* by using a vector A which is a recombinant plasmid comprising the following nucleotide sequences in this order:

- an artificial consensus splicing acceptor site;
- a synthetic "stop/start" sequence;
- Gal4 DNA binding domain-P53 fusion gene as a reporter gene;
- a drug resistance gene;
- a gene responsible for a detectable phenotype of the *Drosophila melanogaster*; and
- a synthetic splicing donor site,

and a vector B derived from pCasperhs, which has the heatshock promoter directed Gal4 activator domain-large T antigen fusion gene within polycloning site of the pCasperhs,

which method comprises the steps of:

- (a) introducing each of the vectors A and B into the genomes of separate white minus flies;
- (b) selecting primary transformants for the vector A which are resistant to a drug, and selecting primary transformants for the vector B which have an eye color;
- (c) crossing the primary transformants for the vector A with a transposase source strain to force the vector to jump into other locations;
- (d) selecting secondary transformants for the vector A by

picking up the flies having strong eye color;

(e) crossing the secondary transformants with the primary transformants for the vector B to obtain flies harboring both the vectors A and B;

(f) crossing the flies obtained in the step (e) with an UAS-luciferase harboring fly strain and measuring the reporter gene expression of the resultant flies; and

(g) identifying the trapped gene by cloning and sequencing the cDNAs fused to the reporter gene and the gene responsible for a detectable phenotype of the fly.

17. The method according to claim 16, wherein the vector A is derived from pCasper3.

18. The method according to claim 16 or 17, wherein the gene responsible for a detectable phenotype of the *Drosophila melanogaster* is mini-white gene, and in the step (g) the cDNAs fused to the reporter gene and the mini-white gene are cloned and sequenced.

19. The method according to any one of claims 16 to 18, wherein the drug resistance gene is neomycin-phosphotransferase gene and its promoter is a heatshock promoter, and in the step (b) the transformant resistant to G418 is selected.

Detailed Description of Invention

Technical Field

The present invention relates to a new vector system to

facilitate the cloning and functional analysis of new genes of a fly, *Drosophila melanogaster*, and a method for gene trapping with the vector system.

Background Art

There are numerous examples for application of gene trapping methods in wide range of living organisms including maize and mouse (Gossler et al., . Sciencer, 244:463-465, 1989).

With respect to tools for gene trapping, the application of different types of enhancer trap P-element vectors (Wilson et al., Genes & Development, 3:1301-1313, 1989) for cloning and analyzing trapped genes, as well their use for mosaic analysis with the help of the Gal4/UAS transcription activator system has proven fruitful. However, sometimes the expression pattern of the Gal4 or other reporter gene of the vector construct is affected by enhancers belonging to more than one gene. Similarly, in some cases it is difficult to determine whether the enhancer trap insertion effects the function of one or more of the neighboring genes.

These circumstances altogether with the fact that in some cases the mutant phenotype could be attributed to the changed expression of a gene with its nearest exon located more than 30 kB apart from the insertion site, can lead in unfortunate cases to an ordeal when it's time to clone and analyze the affected gene.

One object of this application is to provide a vector system includes specifically designed artificial regulatory sequences as well as selection methods for easy screening of positive recombinant lines. More especially, this application

intends to provide a vector system of this invention offering much easier and faster cloning opportunities of the affected gene, compared to the widely used enhancer trap P-element vectors. Another object of this application is to provide easier detection method possibilities of the successful trapping events and much higher chance to get more characteristic ("functional") expression patterns of the reporter gene because in the contrary with much of the cases with enhancer trap lines, when using the vector system of this invention, the reporter gene expression is influenced only by a single endogenous transcription unit and effects only the expression of the very same gene.

Disclosure of Invention

The first invention of this application is a vector for trapping an unknown gene of *Drosophila melanogaster*, which is a recombinant plasmid comprising the following nucleotide sequences in this order:

- an artificial consensus splicing acceptor site;
- a synthetic "stop/start" sequence;
- a reporter gene;
- a drug resistance gene;
- a gene responsible for a detectable phenotype of the *Drosophila melanogaster*; and
- a synthetic splicing donor site.

One embodiment of the first invention is that the recombinant plasmid is derived from pCasper3.

Other embodiments of the first invention are that the reporter gene is the Gal4 gene, Gal4 DNA binding domain-P53

fusion gene or the Gal4-firefly luciferase fusion gene.

Further embodiment of this first invention is that the gene responsible for a detectable phenotype of the *Drosophila melanogaster* is mini-white gene.

More further embodiment of the first invention is that the drug resistance gene is neomycin-phosphotransferase gene and its promoter is a heatshock promoter.

The second invention of this application is a method for trapping an unknown gene of a *Drosophila melanogaster* by using a vector which is a recombinant plasmid comprising the following nucleotide sequences in this order:

an artificial consensus splicing acceptor site;

a synthetic "stop/start" sequence;

a reporter gene;

a drug resistance gene;

a gene responsible for a detectable phenotype of the *Drosophila melanogaster*; and

a synthetic splicing donor site,

which method comprises the steps of:

(a) introducing the vector into the genome of a white minus fly;

(b) selecting primary transformants resistant to a drug;

(c) crossing the primary transformants with a transposase source strain to force the vector to jump into other locations;

(d) selecting secondary transformants by picking up the flies having strong eye color,

(e) crossing the secondary transformants with UAS (Upstream Activator Sequence)-luciferase harboring strain and measuring

the reporter gene expression of the resultant flies; and

(f) identifying the trapped gene by cloning and sequencing the cDNAs fused to the reporter gene and the gene responsible for a detectable phenotype of the fly.

The third invention of this application is a method for trapping an unknown gene of a *Drosophila melanogaster* by using a vector A which is a recombinant plasmid comprising the following nucleotide sequences in this order:

an artificial consensus splicing acceptor site;

a synthetic "stop/start" sequence;

Gal4 DNA binding domain-P53 fusion gene as a reporter gene;

a drug resistance gene;

a gene responsible for a detectable phenotype of the *Drosophila melanogaster*; and

a synthetic splicing donor site,

and a vector B derived from pCasperhs, which has the heatshock promoter directed Gal4 activator domain-large T antigen fusion gene within polycloning site of the pCasperhs,

which method comprises the steps of:

(a) introducing each of the vectors A and B into the genomes of separate white minus flies;

(b) selecting primary transformants for the vector A which are resistant to the drug, and selecting primary transformants for the vector B which have an eye color;

(c) crossing the primary transformants for the vector A with a transposase source strain to force the vector to jump into other locations;

(d) selecting secondary transformants for the vector A by

picking up the flies having strong eye color;

(e) crossing the secondary transformants with the primary transformants for the vector B to obtain flies harboring both the vectors A and B;

(f) crossing the flies obtained in the step (e) with an UAS-luciferase harboring fly strain and measuring the reporter gene expression of the resultant flies; and

(g) identifying the trapped gene by cloning and sequencing the cDNAs fused to the reporter gene and the gene responsible for a detectable phenotype of the fly.

Embodiments of the second and third inventions are corresponded to the embodiments of the first invention, and they will be more precisely described in the following description.

A Mode for Carrying Out the Invention

A vector construct of the first invention, for example, can be based on the commonly used, P-element transformation vector, pCasper3 (Pirotta, Vectors: A survey of molecular cloning vectors and their uses, eds. Rodriguez, R.L. & Denhardt, D.T., Butterworths, Boston. 437-456, 1998) and the convenient Gal4-UAS expression system (Brand and Perrimon, Development, 118:401-415, 1993).

A promoterless Gal4 gene preceded by an artificial consensus splicing acceptor site and a synthetic "stop/start" sequence to govern the read through translation coming from upstream exon(s) of the trapped gene into the proper reading frame of Gal4 was inserted into the polycloning site of

pCasper3.

The removal of the whole 3' UTR (untranslated region) sequence of the mini-white gene and replacement by an artificial splicing donor site resulted in a truncated gene without its own poly-adenylation site.

Without a successful gene trapping event this truncated mini-white gene was not expected to confer any eye color, therefore in this invention a heatshock promoter directed neomycin-phosphotransferase (hs-neo) gene for helping selection of primary transformants by antibiotic feeding has been inserted.

Figure 1 shows the schematic map of the gene trap construct (pTrap-hsneo), and SEQ ID No.1 is the complete nucleotide sequence of the vector pTrap-hsneo.

Another gene trap construct, pTrap-G4-p53 (Figure 2) is created by replacing the Gal4 coding sequence of plasmid pTrap-hsneo with a Gal4 DNA binding domain-P53 fusion gene (Clontech, Matchmaker Two Hybrid System, #K1605-1). When this construct coexists in the genome of the same fly with another vector, pCasperhs-G4-LT (Figure 3) containing a heatshock promoter directed Gal4 activator domain-large T antigen (Clontech, Matchmaker Two Hybrid System, #K1605-1) fusion gene, the assembly of a functional Gal4 molecule, through p53-large T antigen interaction, can be regulated by external heatshock.

On this way, the possibility of an intentional temporary control of Gal4 activity became available. In other words the Gal4 expression in a pattern already determined spatially by the promoter of the trapped gene now can be induced at any desired stage of development by external heatshock.

In order to make the detection of Gal4 expression easier, the Gal4 gene in another construct is replaced with a Gal4-firefly luciferase fusion gene to get pTrap-G4-luc (Figure 4). This artificial gene is coding for a fusion polypeptide which has preserved both enzymatic activities.

The easy measuring of luciferase activity by luminoassay (Brandes et al., Neuron, 16:687-694, 1996) makes the detection of Gal4 activity comfortable in every single living fly.

Then, one of the best mode of the second or third invention, a method for gene trapping using the vector system, is described in detail.

(1) Screening:

The gene trap vector constructs can be introduced into the genome of a white minus fly by microinjection. The selection of primary transformants is possible by using G418, an analog of neomycin, resistance conferred by hs-neo gene. (When performing transformation experiments with these constructs it's turned out that the truncated mini-white gene generally provides a very slight yellow eye color which could be distinguished from w- phenotype in most of the cases, therefore G418 selection apparently is not necessary.)

After a line with the gene trap construct is being established, the secondary transformants can be generated on the usual way by crossing the original line with a so-called jumpstarter containing the transposase expressing delta 2-3 genetic element.

Usually a certain percentage, between 4 and 8, of the secondary transformants have much stronger eye color (deep

orange or reddish) than the ancestor fly indicating that the construct was being inserted downstream of a promoter and now the mini-white gene is using the transcriptional "facilities" of that gene (e.g.: poly-adenylation site and transcriptional terminator) instead of its removed ones. They are the most likely candidates for successful gene trap events. In case of these lines the vector probably has been inserted either into an intron of a gene or upstream from the first intron into the 5' UTR in proper orientation (that is the direction of transcription is same for the "trapped gene" and the mini-white (and Gal4) genes as well). The mini-white gene has its own promoter therefore its expression pattern is supposed to be largely independent from that of the trapped gene.

These positive lines are to be checked in the next step for Gal4 expression by crossing them with a "marker" line harboring a UAS-luciferase reporter gene construct. (When using pTrap-G4-luc vector, this step is obviously not necessary.) Usually very strong correlation was found between eye color and Gal4 expression: more than 90% of the lines having strong eye color proved to be expressing Gal4 by means of luciferase assay using luminometer (Brandes et al., Neuron, 16:687-692, 1996).

(2) Cloning:

When the gene trap construct is being inserted into an intron of an endogenous gene, the marker genes of the construct are supposed to be spliced on mRNA level to the exons of the trapped gene by using the artificial splicing acceptor and donor sites. More exactly while the Gal4 mRNA should be joint

to the exon(s) located upstream of the insertion site, at the same time the mini-white mRNA is fused to the following exon(s) accomplishing the dual tagging of the trapped gene (Figure 5).

This feature can be used for quickly and easily identifying the trapped gene by means of 3' and 5' RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends) experiments. Even cloning and sequencing only a part of the caught mRNA still provides reasonable chance to find homologous mRNAs in the BDGP (Berkeley Drosophila Genome Project) EST (Expressed Sequence Tag) library.

With these approaches, the identification of an already cloned gene can take less than a week compared to the usually more than one year period in average when analyzing a mutant created by some enhancer trap construct.

It's well-known from the literature and the present inventors also have experienced that P-element vectors tend to integrate into or near the 5' UTR of active genes. (The present inventors found that in these cases if the insertion happened upstream from the first intron, and therefore the artificial splicing acceptor site could not be utilized, the Gal4 gene was expressed by read-through transcription from the nearby promoter.)

The advantage of this tendency can be taken by cloning and sequencing the flanking genomic sequences of the insertion site by inverse or vectorette PCR or by plasmid rescue using suitable restriction digestion to recover the neomycin resistance gene of the construct. Then again the BDGP library can be searched to find any significant matching.

(3) Rescue:

The only reliable way to confirm that any observed mutant phenotype is really the consequence of the P-element insertion is to rescue that particular phenotype. Expectedly the phenotype (some alteration from wild type fly) is caused by changed expression of gene(s) disturbed by insertion of the P-element. The rescue can be made by expressing the cDNA of the suspected gene most preferable with identical spatial and temporary pattern than that of the gene itself.

As it was expected, the vector constructs of the first invention usually cause strong phenotypes. It's not surprising at all because the trapped genes are supposed to be split into two parts on mRNA level resulting in null mutants in majority of the cases. Accordingly mutants obtained by this method frequently show homozygous lethality or sterility. Hypomorphic mutants can be obtained by forcing imprecise excision of the gene trap P-element construct.

As mentioned above, the Gal4 expression is obliged to reflect precisely to that of the trapped gene simply because the Gal4 gene has no its own promoter and they share a common, fused mRNA.

This identical expression provides unique opportunity to rescue the mutant phenotype by crossing this fly with another one harboring the UAS directed, cloned cDNA of the trapped gene.

On this way either the original, homozygous null mutant gene trap fly or any transheterozygous derivative of that with some hypomorphic allele over the null mutant allele can be rescued.

(4) Determination of spatial and developmental expression pattern of the trapped gene:

Histochemical determination of the spatially and temporarily controlled expression of any trapped gene is also easy following introduction of a UAS-lacZ construct into the genome of the same fly and performing either X-gal or antibody staining against beta-galactosidase.

(5) Mosaic analysis:

Possession of a large collection of fly lines with different, characteristic and, in the case of pTrap-G4-p53/pCasperhs-G4-TL vector system, inducible Gal4 expression pattern makes feasible carrying out mosaic analysis of virtually any gene of interest by directing the expression of their UAS-constructs on a mutant background with different Gal4 expression patterns.

This approach can answer the question of where and when that particular gene is required to be expressed to rescue the mutant phenotype.

Similarly, any gene can be expressed in different ectopic patterns to generate new dominant mutant phenotypes. This approach might help to conclude the role of that particular gene and to identify the pathway, in which it's involved.

Example

The following example illustrates a specific embodiment of the various aspects of the invention. This example is not

intended to limit the invention in any manner.

Figure 6 shows the results of sequencing RT-PCR products of aop-Gal4 and m-white-aop fusion mRNAs.

The template was total RNA prepared from a positive gene trap line which has the vector pTrap-hsneo being integrated into the first intron of the well-known aop (anterior open/pokkuri/yan) developmental gene. The sequences confirm that both splicing occurred precisely at that particular nucleotides of the artificial regulatory sequences where it was expected.

On Figure 7, there are pictures of characteristic beta-galactosidase staining patterns in different parts of the fly brain resulted from crossing positive gene trap lines with flies harboring a UAS-lacZ construct.

Effects of the Invention

The vector system of this invention offers an exceptional opportunity for easy and fast cloning of the gene responsible for the observed phenotype. Furthermore, by using the UAS-driven coding sequence of any gene of interest, that particular gene can be expressed in identical patterns than those of the trapped genes and these expressions can be regulated temporarily at any desired developmental stage.

Sequence Listing

SEQ ID No.:1

LENGTH: 11206 base pairs

TYPE: nucleic acid

STRANDEDNESS: double

TOPLOGY: circular

MOLECULAR TYPE: DNA

FEATURE:

LOCATIONS : kind of sequence
 0001-0237 : 3' P sequence
 0238-0274 : synthetic splicing acceptor site and
 stop/start sequence
 0275-3164 : Gal4 gene (coding region and 3' UTR)
 3165-3426 : hsp70 terminator
 3427-3457 : synthetic junction sequence
 3458-4907 : heat shock promoter directed neomycine
 resistance gene on complement strand
 4908-8275 : mini-white gene
 8276-8299 : synthetic splicing donor site
 8300-8446 : 5' P sequence
 8447-11206: bacterial part of pCasper3 shuttle vector
 including complete pUC8 sequence
 0238-0274 : synthetic DNA
 3427-3457 : synthetic DNA
 4908-4914 : synthetic DNA
 8276-8299 : synthetic DNA

SEQUENCE:

CATGATGAAA TAACATAAGG TGGTCCCGTC GGCAAGAGAC ATCCACTTAA CGTATGCTTG	60
CAATAAGTGC GAGTGAAAGG AATAGTATTC TGAGTGTGCT ATTGAGTCTG AGTGAGACAG	120
CGATATGATT GTTGATTAAC CCTTAGCATG TCCGTGGGGT TTGAATTAAC TCATAATATT	180
AATTAGACGA AATTATTTTT AAAGTTTTAT TTTTAATAAT TTGCGAGTAC GCAAAGCTCT	240
TTCTCTTACA GGTCGAATTG ATGTGATGGA TCCAATGAAG CTACTGTCTT CTATCGAACA	300
AGCATGCGAT ATTTGCCGAC TTA AAAAGCT CAAGTGCTCC AAAGAAAAAC CGAAGTGCGC	360
CAAGTGTCTG AAGAACAAGT GGGAGTGTGG CTACTCTCCC AAAACCAAAA GGTCTCCGCT	420

GACTAGGGCA CATCTGACAG AAGTGAATC AAGGCTAGAA AGACTGGAAC AGCTATTTCT	480
ACTGATTTTT CCTCGAGAAG ACCTTGACAT GATTTTGAAA ATGGATTCTT TACAGGATAT	540
AAAAGCATTG TTAACAGGAT TATTTGTACA AGATAATGTG AATAAAGATG CCGTCACAGA	600
TAGATTGGCT TCAGTGGAGA CTGATATGCC TCTAACATTG AGACAGCATA GAATAAGTGC	660
GACATCATCA TCGGAAGAGA GTAGTAACAA AGGTCAAAGA CAGTTGACTG TATCGATTGA	720
CTCGGCAGCT CATCATGATA ACTCCACAAT TCCGTTGGAT TTTATGCCCA GGGATGCTCT	780
TCATGGATTT GATTGGTCTG AAGAGGATGA CATGTCCGAT GGCTTGGCCT TCCTGAAAAC	840
GGACCCCAAC AATAATGGGT TCTTTGGCGA CGGTTCTCTC TTATGTATTC TTCGATCTAT	900
TGGCTTTAAA CCGGAAAATT ACACGAACTC TAACGTTAAC AGGCTCCCGA CCATGATTAC	960
GGATAGATAC ACGTTGGCTT CTAGATCCAC AACATCCCGT TTAATTCAAA GTTATCTCAA	1020
TAATTTTCAC CCTACTGCC CTATCGTGCA CTCACCGACG CTAATGATGT TGTATAATAA	1080
CCAGATTGAA ATCGCGTCGA AGGATCAATG GCAAATCCTT TTAACTGCA TATTAGCCAT	1140
TGGAGCCTGG TGTATAGAGG GGGAACTCTAC TGATATAGAT GTTTTTTACT ATCAAAATGC	1200
TAAATCTCAT TTGACGAGCA AGGTCTTCGA GTCAGGTTCC ATAATTTTGG TGACAGCCCT	1260
ACATCTTCTG TCGCGATATA CACAGTGGAG GCAGAAAACA AATACTAGCT ATAATTTTCA	1320
CAGCTTTTCC ATAAGAATGG CCATATCATT GGGCTTGAAT AGGGACCTCC CCTCGTCCTT	1380
CAGTGATAGC AGCATTCTGG AACAAAGACG CCGAATTTGG TGGTCTGTCT ACTCTTGGGA	1440
GATCCAATTG TCCTGCTTT ATGGTCGATC CATCCAGCTT TCTCAGAATA CAATCTCCTT	1500
CCCTTCTTCT GTCGACGATG TGCAGCGTAC CACAACAGGT CCCACCATAT ATCATGGCAT	1560
CATTGAAACA GCAAGGCTCT TACAAATTTT CACAAAAATC TATGAACTAG ACAAACAGT	1620
AACTGCAGAA AAAAGTCCTA TATGTGCAAA AAAATGCTTG ATGATTTGTA ATGAGATTGA	1680
GGAGGTTTCG AGACAGGCAC CAAAGTTTTT ACAAATGGAT ATTTCCACCA CCGCTCTAAC	1740
CAATTTGTTG AAGGAACACC GTTGGCTATC CTTTACAAGA TTCGAACTGA AGTGGAACA	1800
GTTGTCTGTT ATCATTTATG TATTAAGAGA TTTTTCACCT AATTTTACCC AGAAAAAGTC	1860
ACAACTAGAA CAGGATCAAA ATGATCATCA AAGTTATGAA GTTAAACGAT GCTCCATCAT	1920
GTTAAGCGAT GCAGCACAAA GAACTGTTAT GTCTGTAAGT AGCTATATGG ACAATCATAA	1980
TGTCACCCCA TATTTTGCCT GGAATTGTTT TTATTACTTG TTCAATGCAG TCCTAGTACC	2040
CATAAAGACT CTAATCTCAA ACTCAAAATC GAATGCTGAG AATAACGAGA CCGCACAATT	2100
ATTACAACAA ATTAACACTG TTCTGATGCT ATTAACAAAA CTGGCCACTT TTAATATCCA	2160

GACTTGTGAA AAATACATTC AAGTACTGGA AGAGGTATGT GCGCCGTTTC TGTTATCACA	2220
GTGTGCAATC CCATTACCGC ATATCAGTTA TAACAATAGT AATGGTAGCG CCATTAAAAA	2280
TATTGTCCGT TCTGCAACTA TCGCCCAATA CCTACTCTT CCGGAGGAAA ATGTCAACAA	2340
TATCAGTGTT AAATATGTTT CTCCTGGCTC AGTAGGGCCT TCACCTGTGC CATTGAAATC	2400
AGGAGCAAGT TTCAGTGATC TAGTCAAGCT GTTATCTAAC CGTCCACCCT CTCGTAACTC	2460
TCCAGTGACA ATACCAAGAA GCACACCTTC GCATCGCTCA GTCACGCCCT TTCTAGGGCA	2520
ACAGCAACAG CTGCAATCAT TAGTGCCACT GACCCCGTCT GCTTTGTTTG GTGGCGCCAA	2580
TTTTAATCAA AGTGGGAATA TTGCTGATAG CTCATTGTCC TTCACTTTCA CTAACAGTAG	2640
CAACGGTCCG AACCTCATAA CAACTCAAAC AAATTCTCAA GCGCTTTCAC AACCAATTGC	2700
CTCCTCTAAC GTTCATGATA ACTTCATGAA TAATGAAATC ACGGCTAGTA AAATTGATGA	2760
TGGTAATAAT TCAAAACCAC TGTCACCTGG TTGGACGGAC CAAACTGCGT ATAACGCGTT	2820
TGGAATCACT ACAGGGATGT TTAATACCAC TACAATGGAT GATGTATATA ACTATCTATT	2880
CGATGATGAA GATACCCAC CAAACCCAAA AAAAGAGTAA AATGAATCGT AGATACTGAA	2940
AAACCCCGCA AGTTCACCTC AACTGTGCAT CGTGCACCAT CTCAATTCTT TTCATTTATA	3000
CATCGTTTTG CCTTCTTTTA TGTAACATA CTCCTCTAAG TTTCAATCTT GGCCATGTAA	3060
CCTCTGATCT ATAGAATTTT TTAAATGACT AGAATTAATG CCCATCTTTT TTTTGGACCT	3120
AAATTCTTCA TGAAAATATA TTACGAGGGC TTATTCAGAA GCTTATCGAT ACCGTCGACT	3180
AAAGCCAAAT AGAAATTATT CAGTCTGGC TTAAGTTTTT AAAAGTGATA TTATTTATTT	3240
GGTTGTAACC AACCAAAAGA ATGTAAATAA CTAATACATA ATTATGTTAG TTTTAAGTTA	3300
GCAACAAATT GATTTTAGCT ATATTAGCTA CTTGGTTAAT AAATAGAATA TATTTATTTA	3360
AAGATAATTC GTTTTTATTG TCAGGGAGTG AGTTTGCTTA AAAACTCGTT TAGATCCACT	3420
AGAAGGACCG CGGCTCCTCG ACCGGATCGA AAGGAGGGCG AAGAACTCCA GCATGAGATC	3480
CCCGCGCTGG AGGATCATCC AGCCGGCGTC CCGGAAAACG ATTCGGAAGC CCAACCTTTC	3540
ATAGAAGGCG GCGGTGGAAT CGAAATCTCG TGATGGCAGG TTGGGCGTCG CTTGGTCGGT	3600
CATTTCGAAC CCCAGAGTCC CGCTCAGAAG AACTCGTCAA GAAGGCGATA GAAGGCGATG	3660
CGCTGCGAAT CGGGAGCGGC GATACCGTAA AGCACGAGGA AGCGGTCAGC CCATTGCGCG	3720
CCAAGCTCTT CAGCAATATC ACGGGTAGCC AACGCTATGT CCTGATAGCG GTCGCGCACA	3780
CCCAGCCGGC CACAGTCGAT GAATCCAGAA AAGCGGCCAT TTTCCACCAT GATATTCGGC	3840
AAGCAGGCAT CGCCATGGGT CACGACGAGA TCCTCGCCGT CGGGCATGCG CGCCTTGAGC	3900

CTGGCGAACA GTTCGGCTGG CGCGAGCCCC TGATGCTCTT CGTCCAGATC ATCCTGATCG	3960
ACAAGACCGG CTTCCATCCG AGTACGTGCT CGCTCGATGC GATGTTTCGC TTGGTGGTCG	4020
AATGGGCAGG TAGCCGATC AAGCGTATGC AGCCGCCGCA TTGCATCAGC CATGATGGAT	4080
ACTTTCTCGG CAGGAGCAAG GTGAGATGAC AGGAGATCCT GCCCCGGCAC TTCGCCAAT	4140
AGCAGCCAGT CCCTTCCCGC TTCAGTGACA ACGTCGAGCA CAGCTGCGCA AGGAACGCC	4200
GTGTTGGCCA GCCACGATAG CCGCGCTGCC TCGTCCTGCA GTTCATTCAG GGCACGGAC	4260
AGGTCGGTCT TGACAAAAAG AACCGGGCGC CCCTGCGCTG ACAGCCGGAA CACGGCGGCA	4320
TCAGAGCAGC CGATTGTCTG TTGTGCCAG TCATAGCCGA ATAGCCTCTC CACCCAAGCG	4380
GCCGGAGAAC CTGCGTGCAA TCCATCTTGT TCAATCATGC GAAACGATCC TCATCCTGTC	4440
TCTTGATCAG ATCCCTATT CAGAGTTCTC TTCTTGATT CAATAATTAC TTCTTGGCAG	4500
ATTTAGTAG TTGCAGTTGA TTTACTTGGT TGCTGGTTAC TTTAATTGA TTCACTTTAA	4560
CTTGCACTTT ACTGCAGATT GTTAGCTTG TTCAGCTCGG CTGTGTTATT TGCTTAGCTT	4620
TGCTTAGCG ACGTGTTAC TTTGCTTGT TGAATTGAAT TGTCGCTCCG TAGACGAAGC	4680
GCCTCTATTT ATACTCCGGC GCTCTTTTCG CGAACATTCG AGGCGCGCTC TCTCGAACCA	4740
ACGAGAGCAG TATGCCGTTT ACTGTGTGAC AGAGTGAGAG AGCATTAGTG CAGAGAGGGA	4800
GAGACCCAAA AAGAAAAGAG AGAATAACGA ATAACGGCCA GAGAAATTC TCGAGTTTC	4860
TTTCTGCCAA ACAAATGACC TACCACAATA ACCAGTTTGT TTTGGATCT AGTCCCTAAT	4920
TCTAGTATGT ATGTAAGTTA ATAAAACCT TTTTGGAGA ATGTAGATTT AAAAAACAT	4980
ATTTTTTTTT TATTTTTTAC TGCACTGGAC ATCATTGAAC TTATCTGATC AGTTTTAAAT	5040
TTACTTCGAT CCAAGGGTAT TTGAAGTACC AGGTTCTTTC GATTACCTCT CACTCAAAT	5100
GACATTCCAC TCAAAGTCAG CGCTGTTTGC CTCCTTCTCT GTCCACAGAA ATATCGCGT	5160
CTCTTTCGCC GCTGCGTCCG CTATCTCTTT CGCCACCGTT TGTAGCGTTA CCTAGCGTCA	5220
ATGTCGCGCT TCAGTTGCAC TTTGTCAGCG GTTTCGTGAC GAAGCTCCAA GCGGTTTACG	5280
CCATCAATTA AACACAAAGT GCTGTGCCAA AACTCCTCTC GCTTCTTATT TTTGTTTGT	5340
TTTTGAGTGA TTGGGGTGGT GATTGGTTTT GGGTGGGTAA GCAGGGGAAA GTGTGAAAAA	5400
TCCCGGCAAT GGGCCAAGAG GATCAGGAGC TATTAATTCG CGGAGGCAGC AAACACCCAT	5460
CTGCCGAGCA TCTGAACAAT GTGAGTAGTA CATGTGCATA CATCTTAAGT TCACTTGATC	5520
TATAGGAACT GCGATTGCAA CATCAAATTG TCTGCGGCGT GAGAACTGCG ACCCACAAAA	5580
ATCCCAAACC GCAATCGCAC AAACAAATAG TGACACGAAA CAGATTATTC TGGTAGCTGT	5640

GCTCGCTATA TAAGACAATT TTTAAGATCA TATCATGATC AAGACATCTA AAGGCATTCA	5700
TTTTCGACTA CATTGTTTTT TACAAAAAAT ATAACAACCA GATATTTTAA GCTGATCCTA	5760
GATGCACAAA AAATAAATAA AAGTATAAAC CTA CTTCGTA GGATACTTCG TTTTGTTCGG	5820
GGTTAGATGA GCATAACGCT TGTAGTTGAT ATTTGAGATC CCCTATCATT GCAGGGTGAC	5880
AGCGGACGCT TCGCAGAGCT GCATTAACCA GGGCTTCGGG CAGGCCAAAA ACTACGGCAC	5940
GTCCTGCCA CCCAGTCCGC CGGAGGACTC CGGTT CAGGG AGCGGCCAAC TAGCCGAGAA	6000
CCTCACCTAT GCCTGGCACA ATATGGACAT CTTTGGGGCG GTCAATCAGC CGGGCTCCGG	6060
ATGGCGGCAG CTGGTCAACC GGACACGCGG ACTATTCTGC AACGAGCGAC ACATACCGGC	6120
GCCCAGGAAA CATTGCTCA AGAACGGTGA GTTTCTATTC GCAGTCGGCT GATCTGTGTG	6180
AAATCTTAAT AAAGGGTCCA ATTACCAATT TGAAACTCAG TTTGCGGCGT GGCTATCCG	6240
GGCGAACTTT TGGCCGTGAT GGGCAGTTC GGTGCCGGAA AGACGACCCCT GCTGAATGCC	6300
CTTGCTTTTC GATCGCCGCA GGGCATCCAA GTATCGCCAT CCGGGATGCG ACTGCTCAAT	6360
GGCCAACTG TGGACGCCAA GGAGATGCAG GCCAGGTGCG CCTATGTCCA GCAGGATGAC	6420
CTCTTTATCG GCTCCCTAAC GGCCAGGGAA CACCTGATTT TCCAGGCCAT GGTGCGGATG	6480
CCACGACATC TGACCTATCG GCAGCGAGTG GCGCGCGTGG ATCAGGTGAT CCAGGAGCTT	6540
TCGCTCAGCA AATGTCAGCA CACGATCATC GGTGTGCCCG GCAGGGTGAA AGGTCTGTCC	6600
GGCGGAGAAA GGAAGCGTCT GGCATTGCGC TCGAGGCAC TAACCGATCC GCGCTTCTG	6660
ATCTGCGATG AGCCACCTC CGGACTGGAC TCATTTACCG CCCACAGCGT CGTCCAGGTG	6720
CTGAAGAAGC TGTCGCAGAA GGGCAAGACC GTCATCCTGA CCATTCATCA GCGTCTTCC	6780
GAGCTGTTTG AGCTCTTTGA CAAGATCCTT CTGATGGCCG AGGGCAGGGT AGCTTTCTTG	6840
GGCACTCCCA GCGAAGCCGT CGACTTCTTT TCCTAGTGAG TTCGATGTGT TTATTAAGGG	6900
TATCTAGCAT TACATTACAT CTCAACTCCT ATCCAGCGTG GGTGCCCAGT GTCCTACCAA	6960
CTACAATCCG GCGGACTTTT ACGTACAGGT GTTGGCCGTT GTGCCCGGAC GGGAGATCGA	7020
GTCCCGTGAT CGGATCGCCA AGATATGCGA CAATTTTGCT ATTAGCAAAG TAGCCCGGGA	7080
TATGGAGCAG TTGTTGGCCA CAAAAATTT GGAGAAGCCA CTGGAGCAGC CGGAGAATGG	7140
GTACACCTAC AAGGCCACCT GGTTCATGCA GTTCCGGGCG GTCCTGTGCG GATCCTGGCT	7200
GTCGGTGCTC AAGGAACCAC TCCTCGTAAA AGTGCGACTT ATTCAGACAA CGGTGAGTGG	7260
TTCCAGTGGA AACAAATGAT ATAACGCTTA CAATCTTGG AAACAAATTC GCTAGATTTT	7320
AGTTAGAATT GCCTGATTCC ACACCCCTCT TAGTTTTTTT CAATGAGATG TATAGTTTAT	7380

AGTTTTGCAG AAAATAAATA AATTTCAATT AACTCGCGAA CATGTTGAAG ATATGAATAT	7440
TAATGAGATG CGAGTAACAT TTAAATTTGC AGATGGTTGC CATCTTGATT GGCCTCATCT	7500
TTTTGGGCCA ACAACTCAG CAAGTGGGCG TGATGAATAT CAACGGAGCC ATCTTCCTCT	7560
TCCTGACCAA CATGACCTTT CAAAACGTCT TTGCCACGAT AAATGTAAGT CTTGTTTAGA	7620
ATACATTTGC ATATTAATAA TTTACTAACT TTCTAATGAA TCGATTGAT TTAGGTGTTG	7680
ACCTCAGAGC TGCCAGTTTT TATGAGGGAG GCGCGAAGTC GACTTTATCG CTGTGACACA	7740
TACTTTCTGG GCAAAACGAT TGCCGAATTA CCGCTTTTTC TCACAGTGC ACTGGTCTTC	7800
ACGGCGATTG CCTATCCGAT GATCGGACTG CGGGCGGAG TGCTGCACTT CTTCAACTGC	7860
CTGGCGCTGG TCACTCTGGT GGCCAATGTG TCAACGTCT TCGGATATCT AATATCCTGC	7920
GCCAGCTCCT CGACCTCGAT GGCGCTGTCT GTGGGTCCGC CGGTTATCAT ACCATTCTG	7980
CTCTTTGGCG GCTTCTTCTT GAACTCGGGC TCGGTGCCAG TATACCTCAA ATGGTTGTGG	8040
TACCTCTCAT GGTTCGGTTA CGCCAACGAG GGTCTGCTGA TTAACCAATG GGCGGACGTG	8100
GAGCGGGGCG AAATTAGCTG CACATCGTCG AACACCACGT GCGCCAGTTC GGGCAAGGTC	8160
ATCCTGGAGA CGCTTAACTT CTCCGCCGCC GATCTGCCG TGGACTACGT GGGTCTGGCC	8220
ATTCTCATCG TGAGCTTCGG GGTGCTCGCA TATCTGGCTC TAAGACTTCG GGCCCGACGC	8280
AAGGAGTAGA AGGTAAGTAG CGGCCGCACG TAAGGGTTAA TGTTTTCAA AAAAAATTGG	8340
TCCGCACACA ACCTTTCCTC TCAACAAGCA AACGTGCACT GAATTTAAGT GTATACTTCG	8400
GTAAGCTTCG GCTATCGACG GGACCACCTT ATGTTATTTG ATCATGGGCC AGACCCACGT	8460
AGTCCAGCGG CAGATCGGCG GCGGAGAAGT TAAGCGTCTC CAGGATGACC TTGCCCGAAC	8520
TGGGGCACGT GGTGTTGAC GATGTGCAGC TAATTTGCC CCGCTCCACG TCCGCCATT	8580
GGTTAATCAG CAGACCTCG TTGGCGTAAC GGAACCATGA GAGGTACGAC AACCATTGGA	8640
GGTATACTGG CACCGAGCCC GAGTTCAAGA AGAAGGCGTT TTCCATAGG CTCGCCCCC	8700
CTGACGAGCA TCACAAAAAT CGACGCTCAA GTCAGAGGTG GCGAAACCCG ACAGGACTAT	8760
AAAGATACCA GCGGTTTCCC CCTGGAAGCT CCTCGTGCG CTCTCCTGTT CCGACCCTGC	8820
CGCTTACCGG ATACCTGTCC GCCTTTCTCC CTTCCGGAAG CGTGGCGCTT TCTCAATGCT	8880
CACGCTGTAG GTATCTCAGT TCGGTGTAGG TCGTTGCTC CAAGCTGGGC TGTGTGCACG	8940
AACCCCCGT TCAGCCCGAC CGCTGCGCCT TATCCGGTAA CTATCGTCTT GAGTCCAACC	9000
CGGTAAGACA CGACTTATCG CCACTGGCAG CAGCCACTGG TAACAGGATT AGCAGAGCGA	9060
GGTATGTAGG CCGTGCTACA GAGTTCTGA AGTGGTGGCC TAACTACGGC TACTAGAA	9120

GGACAGTATT TGGTATCTGC GCTCTGCTGA AGCCAGTTAC CTTCGGAAAA AGAGTTGGTA	9180
GCTCTTGATC CGGCAAACAA ACCACCGCTG GTAGCGGTGG TTTTTTTGTT TGCAAGCAGC	9240
AGATTACGCG CAGAAAAAAA GGATCTCAAG AAGATCCTTT GATCTTTTCT ACGGGGTCTG	9300
ACGCTCAGTG GAACGAAAAC TCACGTTAAG GGATTTTGGT CATGAGATTA TCAAAAAGGA	9360
TCTTCACCTA GATCCTTTTA AATTAAAAAT GAAGTTTTAA ATCAATCTAA AGTATATATG	9420
AGTAACTTG GTCTGACAGT TACCAATGCT TAATCAGTGA GGCACCTATC TCAGCGATCT	9480
GTCTATTTTG TTCATCCATA GTTGCCCTGAC TCCCCGTCGT GTAGATAACT ACGATACGGG	9540
AGGGCTTACC ATCTGGCCCC AGTGCTGCAA TGATACCGCG AGACCCACGC TCACCGGCTC	9600
CAGATTTATC AGCAATAAAC CAGCCAGCCG GAAGGGCCGA GCGCAGAAGT GGTCTGCAA	9660
CTTTATCCGC CTCATCCAG TCTATTAATT GTTGCCGGGA AGCTAGAGTA AGTAGTTGCG	9720
CAGTTAATAG TTTGCGCAAC GTTGTTGCCA TTGCTACAGG CATCGTGGTG TCACGCTCGT	9780
CGTTTGGTAT GGCTTCATTC AGTCCGGTT CCGAACGATC AAGGCGAGTT ACATGATCCC	9840
CCATGTTGTG CAAAAAGCG GTTAGCTCCT TCGGTCTCC GATCGTTGTC AGAAGTAAGT	9900
TGGCCGCGAGT GTTATCACTC ATGGTTATGG CAGCACTGCA TAATTCTCTT ACTGTCATGC	9960
CATCCGTAAG ATGCTTTTCT GTGACTGGTG AGTACTCAAC CAAGTCATTC TGAGAATAGT	10020
GTATGCGGCG ACCGAGTTGC TCTTGCCCGG CGTCAACACG GGATAATACC GCGCCACATA	10080
GCAGAACTTT AAAAGTGCTC ATCATTGGAA AACGTTCTTC GGGGCGAAAA CTCTCAAGGA	10140
TCTTACCGCT GTTGAGATCC AGTTCGATGT AACCCTCTCG TGCACCCAAC TGATCTTCAG	10200
CATCTTTTAC TTTACCAGC GTTCTGGGT GAGCAAAAAC AGGAAGGCAA AATGCCGCAA	10260
AAAAGGGAAT AAGGGCGACA CGGAAATGTT GAATACTCAT ACTCTTCTT TTTCAATATT	10320
ATTGAAGCAT TTATCAGGGT TATTGTCTCA TGAGCGGATA CATATTTGAA TGTATTTAGA	10380
AAAATAAACA AATAGGGGT CCGCGCACAT TTCCCCGAAA AGTGCCACCT GACGTCTAAG	10440
AAACCATTAT TATCATGACA TTAACCTATA AAAATAGGCG TATCAGGAGG CCCTTTCGTC	10500
TCGCGCGTTT CCGTGATGAC GGTGAAAACC TCTGACACAT GCAGCTCCCG GAGACGGTCA	10560
CAGCTTGTCT GTAAGCGGAT GCCGGGAGCA GACAAGCCCG TCAGGGCGCG TCAGCGGGTG	10620
TTGGCGGGTG TCGGGGCTGG CTTAACTATG CGGCATCAGA GCAGATTGTA CTGAGAGTGC	10680
ACCATATGCG GTGTGAAATA CCGCACCGAA TCGCGCGGAA CTAACGACAG TCGCTCCAAG	10740
GTCGTCGAAC AAAAGGTGAA TGTGTTGCGG AGAGCGGGTG GGAGACAGCG AAAGAGCAAC	10800
TACGAAACGT GGTGTGGTGG AGGTGAATTA TGAAGAGGGC GCGCGATTG AAAAGTATGT	10860

```

ATATAAAAAA TATATCCCGG TGTTTTATGT AGCGATAAAC GAGTTTTTGA TGTAAGGTAT 10920
GCAGGTGTGT AAGTCTTTTG GTTAGAAGAC AAATCCAAAG TCTACTTGTG GGGATGTTTG 10980
AAGGGGAAAT ACTTGTATTC TATAGGTCAT ATCTTGTTTT TATTGGCACA AATATAATTA 11040
CATTAGCTTT TTGAGGGGGC AATAAACAGT AAACACGATG GTAATAATGG TAAAAAAAAA 11100
AACAAGCAGT TATTTCCGAT ATATGTCGGC TACTCCTTGC GTCGGGCCCG AAGTCTTAGA 11160
GCCAGATATG CGAGCACCCG GAAGCTCAGC ATGAGAATGG CCAGAC 11206

```

Brief Description of Drawings

Figure 1 shows the schematic map of the vector of this invention, pTrap-hsneo.

Figure 2 shows the schematic map of the vector of this invention, pTrap-G4-p53.

Figure 3 shows the schematic map of the vector of this invention, pCasperhs-G4-LT.

Figure 4 shows the schematic map of the vector of this invention, pTrap-G4-luc.

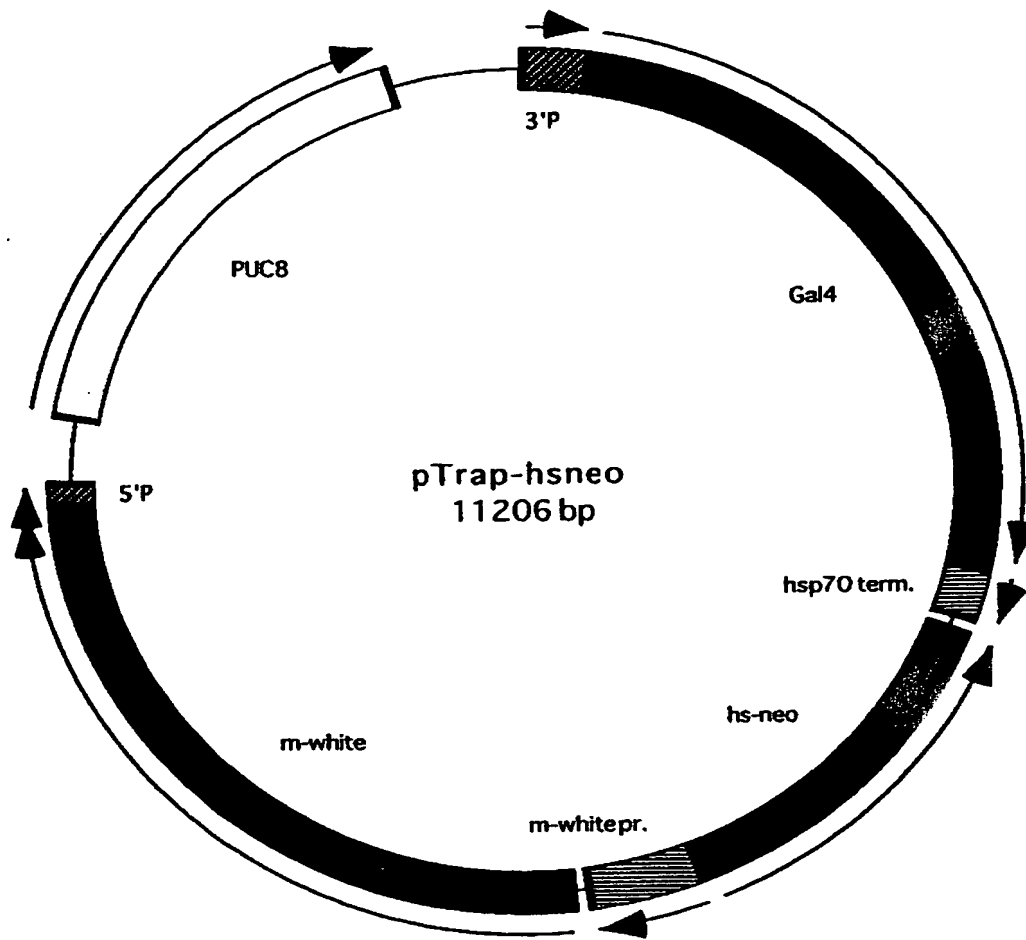
Figure 5 shows the shematic drawing of a fly genome to which the vector of this invention is inserted for cloning.

Figure 6 shows the results of sequencing RT-PCR products of aop-Gal4 and m-white-aop fusion mRNAs.

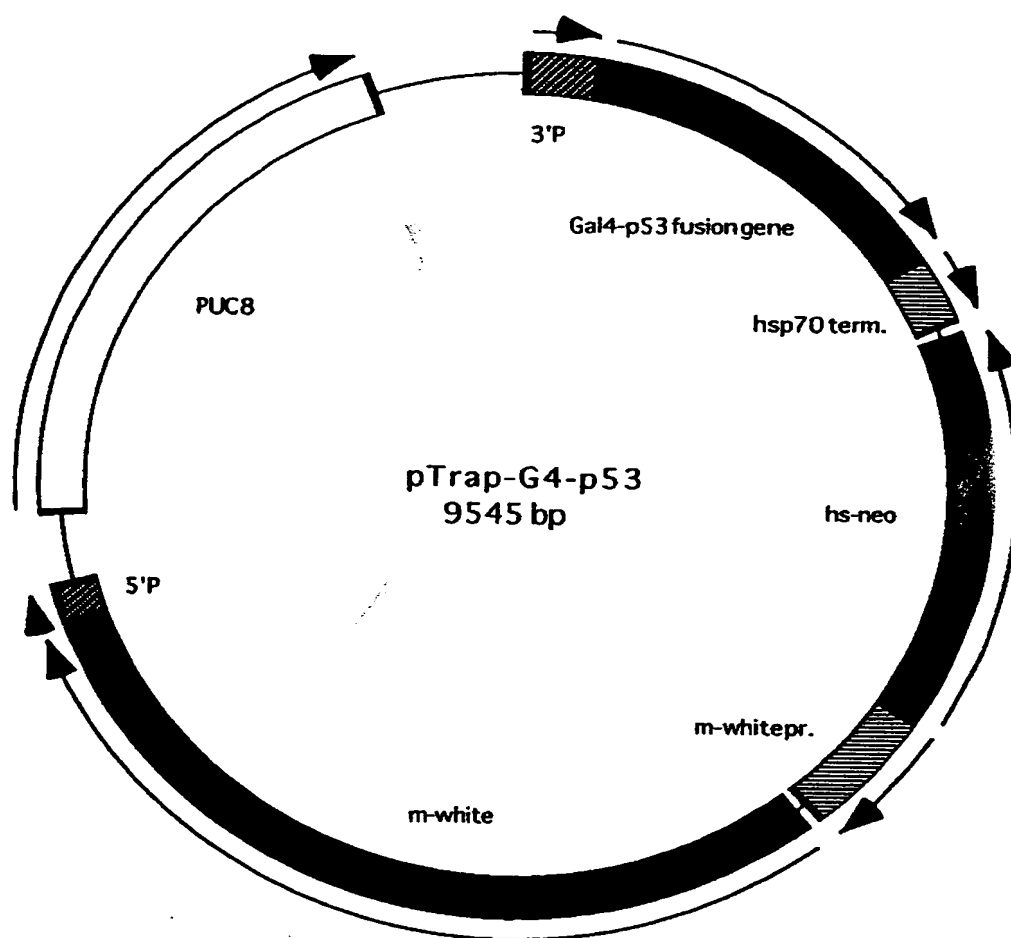
Figure 7 presents pictures of characteristic beta-galactosidase staining patterns in different parts of the fly brain resulted from crossing positive gene trap lines with flies harboring a UAS-lacZ construct.

【書類名】 外国語図面

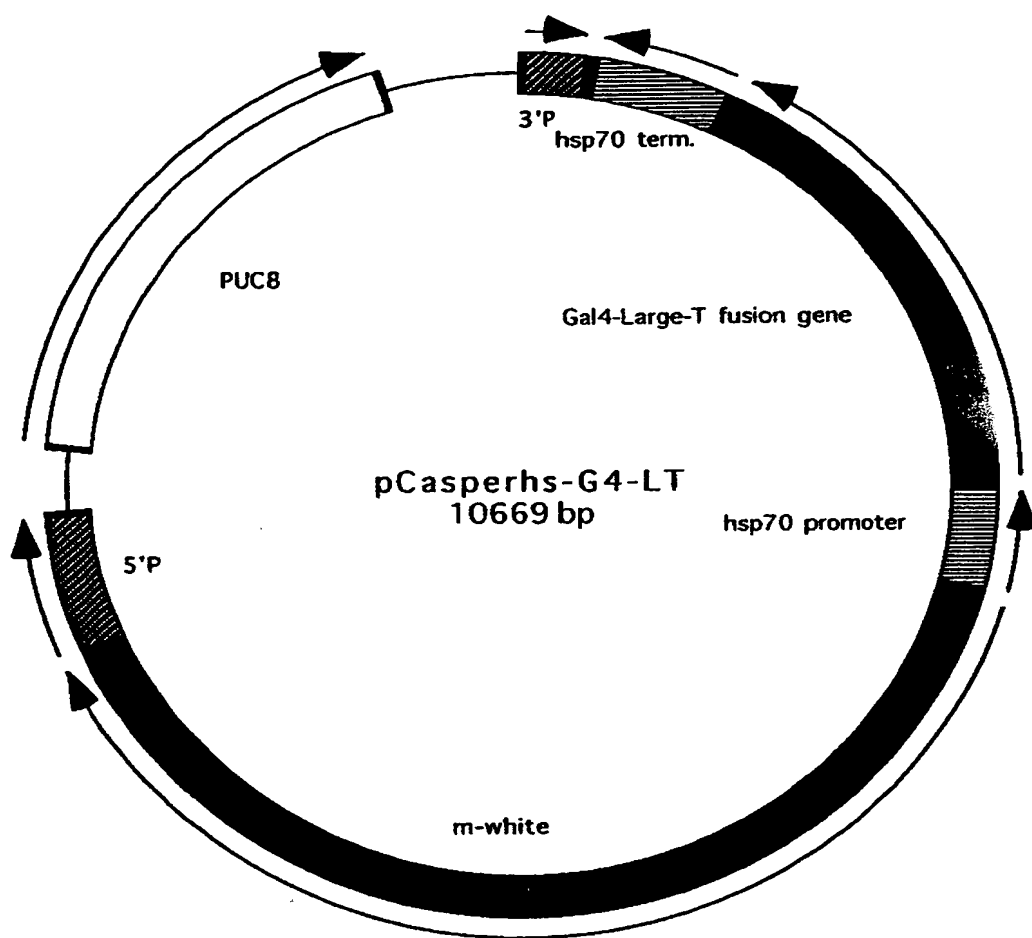
【図 1】



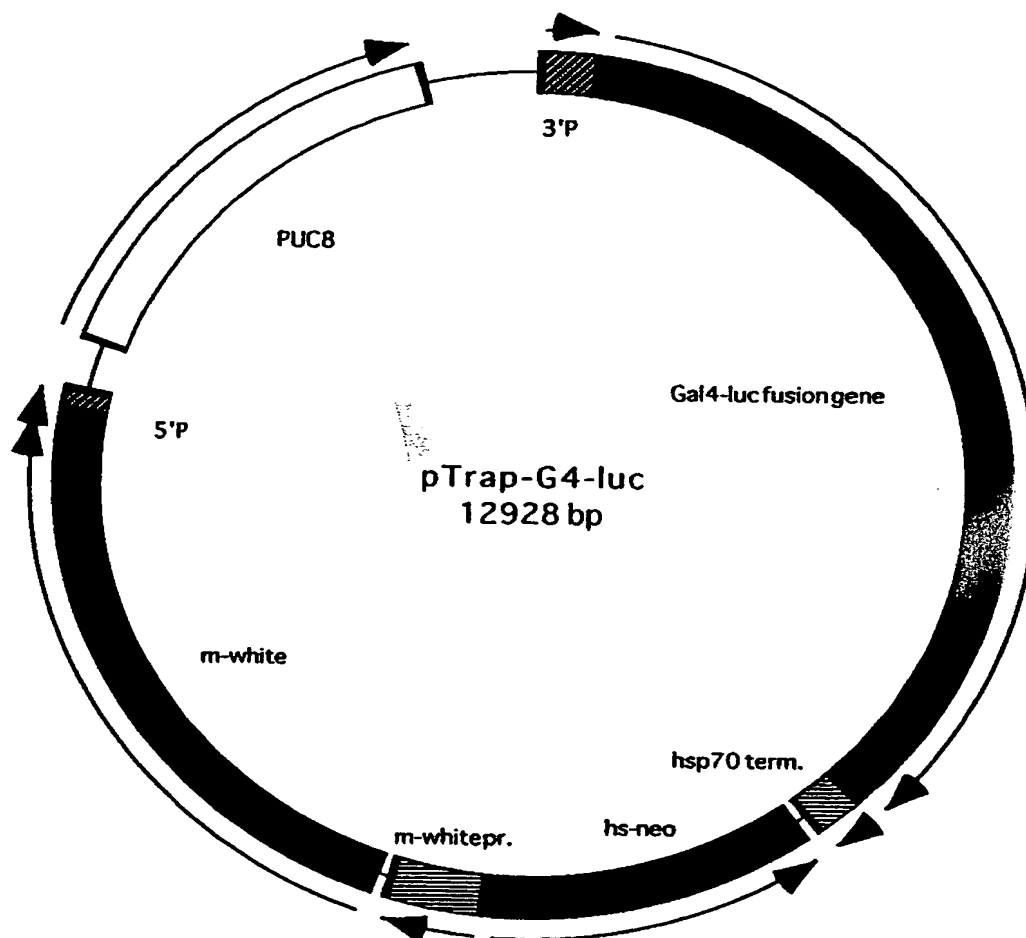
【図 2】



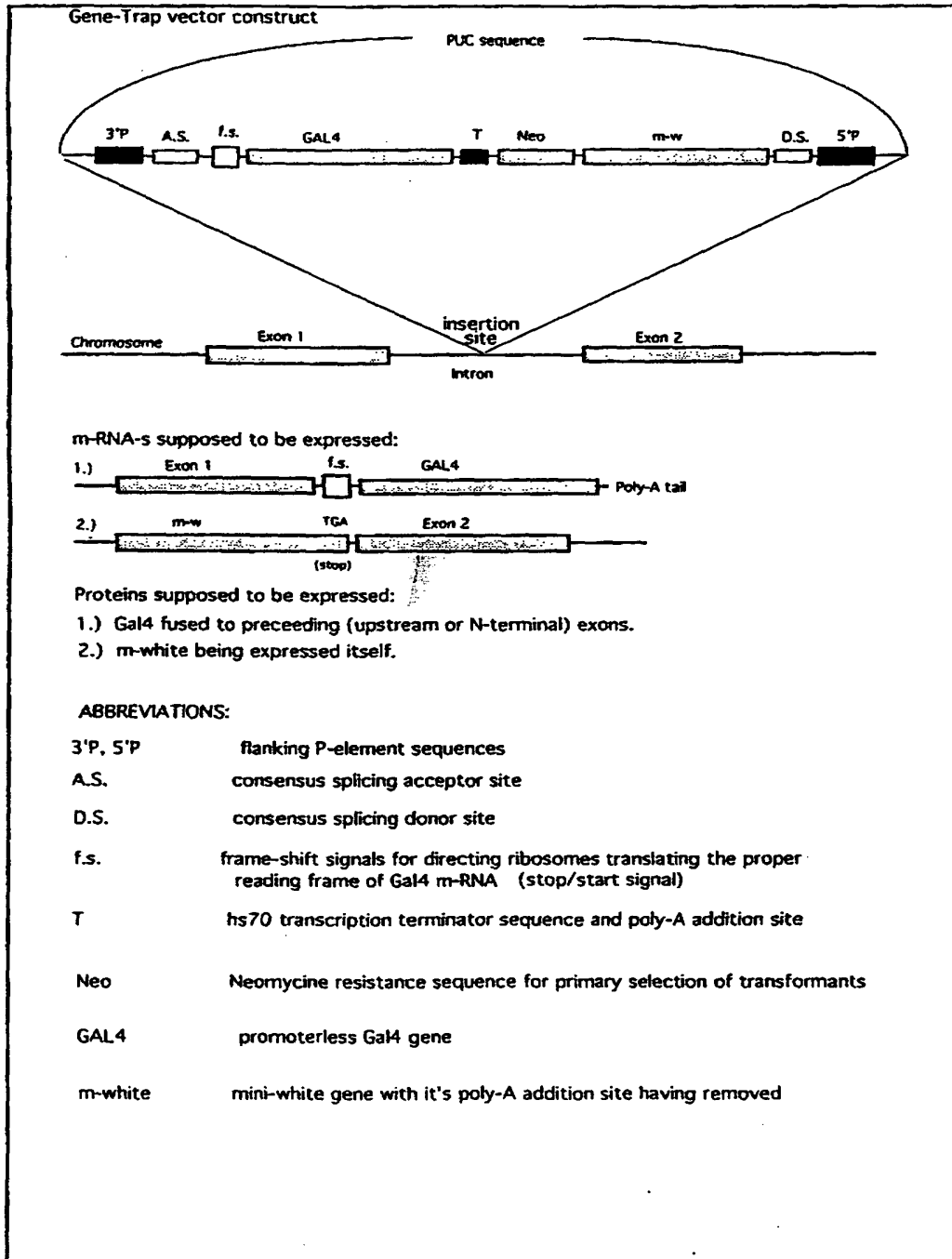
【図3】



【図 4】

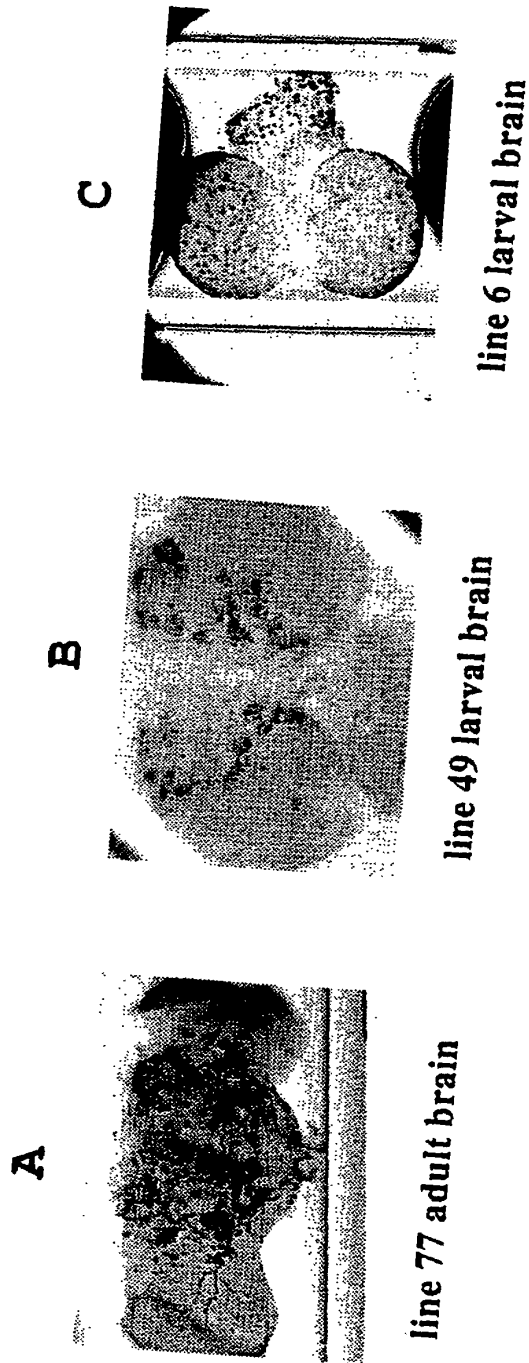


【図 5】



Gal4 expression patterns revealed by UAS-lac-Z reporter constructs.

【图7】



【書類名】 外国語要約書

Abstract

The objects of this patent application are to provide a new vector system to facilitate the cloning and functional analysis of new genes of a fly, *Drosophila melanogaster*, and a method for gene trapping with the vector system.

The present application provide a vector for trapping an unknown gene of *Drosophila melanogaster*, which is a recombinant plasmid comprising the following nucleotide sequences in this order: an artificial consensus splicing acceptor site; a synthetic "stop/start" sequence; a reporter gene; a drug resistance gene; a gene responsible for a detectable phenotype of the *Drosophila melanogaster*; and a synthetic splicing donor site. The present application also provide a method for trapping an unknown gene of a *Drosophila melanogaster* by using the vector.

Representative Drawing : Figure 1.

【書類名】 職権訂正データ
【訂正書類】 特許願

<認定情報・付加情報>

【特許出願人】
【識別番号】 396020800
【住所又は居所】 埼玉県川口市本町4丁目1番8号
【氏名又は名称】 科学技術振興事業団
【代理人】 申請人
【識別番号】 100093230
【住所又は居所】 東京都渋谷区宇田川町37-10 麻仁ビル6階
西澤国際特許事務所
【氏名又は名称】 西澤 利夫

【書類名】 翻訳文提出書

【提出日】 平成10年 7月22日

【あて先】 特許庁長官 殿

【出願の表示】

【出願番号】 平成10年特許願第141952号

【特許出願人】

【識別番号】 396020800

【氏名又は名称】 科学技術振興事業団

【代理人】

【識別番号】 100093230

【弁理士】

【氏名又は名称】 西澤 利夫

【電話番号】 03-5454-7191

【確認事項】 本書に添付した翻訳文は、外国語書面出願の願書に添付して提出した外国語明細書、外国語図面及び外国語要約書に記載した事項を過不足なく適正な日本語に翻訳したものである。

【提出物件の目録】

【物件名】 外国語明細書の翻訳文 1

【物件名】 外国語図面の翻訳文 1

【物件名】 外国語要約書の翻訳文 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 遺伝子トラップ用ベクターと、このベクターを用いた
遺伝子トラップ方法

【特許請求の範囲】

【請求項1】 以下のヌクレオチド配列：

人工の共通スプライシング受容部位、

合成ストップ／スタート配列、

レポーター遺伝子、

薬剤耐性遺伝子、

キイロショウジョウバエの検出可能な表現型の遺伝子、および

合成スプライシング供与部位

をこの順序で有する組換え体プラスミドであるキイロショウジョウバエの未知遺伝子トラップ用ベクター。

【請求項2】 組換え体プラスミドが、pCasper3に由来するプラスミドである請求項1のベクター。

【請求項3】 レポーター遺伝子が、Gal4 遺伝子である請求項1または2のベクター。

【請求項4】 配列番号1のヌクレオチド配列を有する請求項3のベクター

。

【請求項5】 レポーター遺伝子が、Gal4 DNA結合領域-p53 融合遺伝子である請求項1または2のベクター。

【請求項6】 レポーター遺伝子が、Gal4-ほたるルシフェラーゼ融合遺伝子である請求項1または2のベクター。

【請求項7】 キイロショウジョウバエの検出可能な表現型の遺伝子が、ミニ白眼遺伝子である請求項1ないし6のいずれかのベクター。

【請求項8】 薬剤耐性遺伝子が、ネオマイシン-ホスホトランスフェラーゼ遺伝子であり、そのプロモーターがヒートショックプロモーターである請求項1ないし7のいずれかのベクター。

【請求項9】 pCasperhs のポリクローニング部位内に、ヒートショックプ

ロモーターと結合したGal4 活性化領域-ラージT 抗原融合遺伝子を有するpCasperhs 由来ベクター。

【請求項 10】 以下のヌクレオチド配列：

人工の共通スプライシング受容部位、

合成ストップ/スタート配列、

レポーター遺伝子、

薬剤耐性遺伝子、

キイロショウジョウバエの検出可能な表現型の遺伝子、および

合成スプライシング供与部位

をこの順序で有する組換え体プラスミドであるベクターを使用する方法であって、以下のステップ：

(a) 白眼遺伝子を持たないハエのゲノムに前記ベクターを挿入し、

(b) 薬剤耐性である 1 次形質転換体を選択し、

(c) 1 次形質転換体を転移酵素発現系統と交配させてベクターを他の位置に転移させ、

(d) 眼の色が濃いハエを採集することにより 2 次形質転換体を選択し、

(e) 2 次形質転換体を UAS (上流活性化配列) -ルシフェラーゼ含有系統と交配し、産出したハエにおけるレポーター遺伝子の発現を測定し、

(f) トラップされた遺伝子をクローニングにより同定し、レポーター遺伝子およびハエの検出可能な表現型の遺伝子に融合した cDNA 群の配列を決定する、

ことからなるキイロショウジョウバエ未知遺伝子のトラップ方法

【請求項 11】 組換え体プラスミドが、pCasper3 に由来するプラスミドである請求項 10 の方法。

【請求項 12】 ベクターのレポーター遺伝子が、Gal4 遺伝子であり、ステップ (e) において Gal4 の発現を測定する請求項 10 または 11 の方法。

【請求項 13】 ベクターのレポーター遺伝子が Gal4 -ほたるルシフェラーゼ融合遺伝子であり、ステップ (e) において 2 次形質転換体を UAS -ルシフェラーゼ含有系統と交配せずにこの融合遺伝子の発現を測定する請求項 10 ま

たは 11 の方法。

【請求項 14】 キイロショウジョウバエの検出可能な表現型の遺伝子がミニ白眼遺伝子であり、ステップ (f) でレポーター遺伝子およびミニ白眼遺伝子に融合した cDNA をクローニングし、配列決定する請求項 10 ないし 14 のいずれかの方法。

【請求項 15】 薬剤耐性遺伝子がネオマイシン-ホスホトランスフェラーゼ遺伝子、そのプロモーターがヒートショックプロモーターであり、ステップ (b) で G418 耐性形質転換体を選択する請求項 10 ないし 15 のいずれかの方法。

【請求項 16】 以下のヌクレオチド配列：

人工の共通スプライシング受容部位、

合成ストップ/スタート配列、

レポーター遺伝子としての Gal4 DNA 結合領域-p53 融合遺伝子、

薬剤耐性遺伝子、

キイロショウジョウバエの検出可能な表現型の遺伝子、および

合成スプライシング供与部位

をこの順序で有する組換え体プラスミドであるベクター A、および pCasperhs のポリクローニング部位内にヒートショックプロモーターと結合した Gal4 活性化領域-ラージ T 抗原融合遺伝子を有する pCasperhs 由来ベクター B を使用する方法であって、

(a) 白眼遺伝子を持たない別個のハエのゲノムにベクター A およびベクター B をそれぞれ挿入し、

(b) 薬剤耐性であるベクター A の 1 次形質転換体を選択し、眼の色をもつベクター B の 1 次形質転換体を選択し、

(c) ベクター A の 1 次形質転換体を転移酵素発現系統と交配してベクターを他の位置に転移させ、

(d) 眼の色が濃いハエを採集することによりベクター A の 2 次形質転換体を選択し、

(e) この 2 次形質転換体をベクター B の 1 次形質転換体と交配してベクター

AとベクターBの両者を有するハエを産出させ、

(f) ステップ(e) で得たハエをUAS-ルシフェラーゼ含有系統と交配して、その結果産出したハエにおけるレポーター遺伝子の発現を測定し、

(g) トラップされた遺伝子をクローニングにより同定し、レポーター遺伝子およびハエの検出可能な表現型の遺伝子と融合したcDNA群の配列を決定することからなるキイロショウジョウバエの未知遺伝子のトラップ方法。

【請求項17】 ベクターAがpCasper3に由来するプラスミドである請求項16の方法。

【請求項18】 キイロショウジョウバエの検出可能な表現型の遺伝子がミニ白眼遺伝子であり、ステップ(g) でレポーター遺伝子およびミニ白眼遺伝子と融合したcDNA群をクローニングし、配列決定する請求項16または17の方法。

【請求項19】 薬剤耐性遺伝子がネオマイシン-ホスホトランスフェラーゼ遺伝子、そのプロモーターがヒートショックプロモーターであり、ステップ(b) でG418耐性形質転換体を選択する請求項16ないし18のいずれかの方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

この発明は、キイロショウジョウバエ（ドロソフィラ・メラノガステル：Drosophilamelanogaster）の新規遺伝子のクローニングおよび機能分析を容易にする新規ベクター系、およびこのベクター系による遺伝子トラッピングに関するものである。

【0002】

【従来の技術とその課題】

トウモロコシやマウスを含む広範な生物体において、遺伝子トラッピングの応用例が数多く存在する（Gossler et al. Science, 244:463-465, 1989）。

遺伝子トラッピングのための道具としては、トラップされた遺伝子のクローニングおよび分析を目的として種々の型のエンハンサートラップPエレメントベク

ター (Wilson et al., Genes & Development, 3:1301-1313, 1989) の応用、並びに Gal4 / UAS 転写アクティベーター系の協力下でのモザイク解析に関するその使用が効果的であることが証明されている。しかしながら、ベクターコンストラクトまたは他のレポーター遺伝子の発現パターンが 1 種以上の遺伝子に属するエンハンサーにより影響を受ける場合がある。また、エンハンサートラップの挿入により 1 種以上の隣接遺伝子が機能発現するかどうかを決定することが困難な場合もある。

【0003】

これらの事情と、その最も近いエクソンが挿入部位から 30 kb 以上離れて位置している遺伝子の発現変化が変異表現型の原因となる場合があるという事実とが一緒になって、影響を受けた遺伝子をクローンし分析することが困難になることがありうる。

この出願の 1 つの目的は、特別にデザインした人工の調節配列を含むベクター系、および陽性の組換え体系統を容易にスクリーニングするための選択方法を提供することである。より詳しくは、この出願は、広く使用されているエンハンサートラップ P エlement ベクターに比較して、影響を受けた遺伝子を更に容易にかつ迅速にクローニングすることのできるベクター系を提供することを目的としている。この出願の別の目的は、エンハンサートラップ系統を用いる多くの場合とは異なり、この発明のベクター系は、レポーター遺伝子の発現が単一の内因性転写ユニットによってのみ影響され、かつその遺伝子自体の発現のみを生み出すという理由から、得られたトラップ現象を容易に検出し、しかもレポーター遺伝子のより特徴的な（「機能的な」）発現パターンを極めて高い確率で得ることのできる方法を提供することである。

【0004】

【発明の開示】

この出願の第 1 の発明は、以下のヌクレオチド配列：

人工の共通スプライシング受容部位、

合成ストップ/スタート配列、

レポーター遺伝子、

薬剤耐性遺伝子、

キイロショウジョウバエの検出可能な表現型の遺伝子、および

合成スプライシング供与部位

をこの順序で有する組換え体プラスミドであるキイロショウジョウバエの未知遺伝子トラップ用ベクターである。

【0005】

この第1発明の1つの実施態様は、組換え体プラスミドとして、pCasper3に由来するプラスミドを用いることである。

第1発明の他の実施態様は、レポーター遺伝をGal4遺伝子、Gal4 DNA結合領域-p53融合遺伝子、またはGal4-ほたるルシフェラーゼ融合遺伝子とすることである。

【0006】

この第1発明の別の実施態様は、キイロショウジョウバエにおける検出可能な表現型の遺伝子をミニ白眼遺伝子とすることである。

第1発明のさらに他の実施態様は、薬剤耐性遺伝子をネオマイシン-ホスホトランスフェラーゼ遺伝子とし、そのプロモーターをヒートショックプロモーターとすることである。

【0007】

この出願の第2の発明は、以下のヌクレオチド配列：

人工の共通スプライシング受容部位、

合成ストップ/スタート配列、

レポーター遺伝子、

薬剤耐性遺伝子、

キイロショウジョウバエの検出可能な表現型の遺伝子、および

合成スプライシング供与部位

をこの順序で有する組換え体プラスミドであるベクターを使用する方法であって、以下のステップ：

(a) 白眼遺伝子を持たないハエのゲノムに前記ベクターを挿入し、

(b) 薬剤耐性である1次形質転換体を選択し、

(c) 1次形質転換体を転移酵素発現系統と交配させてベクターを他の位置に転移させ、

(d) 眼の色が濃いハエを採集することにより2次形質転換体を選択し、

(e) 2次形質転換体をUAS（上流活性化配列）-ルシフェラーゼ含有系統と交配し、産出したハエにおけるレポーター遺伝子の発現を測定し、

(f) トラップされた遺伝子をクローニングにより同定し、レポーター遺伝子およびハエの検出可能な表現型の遺伝子に融合したcDNA群の配列を決定する

、
ことからなるキイロショウジョウバエ未知遺伝子のトラップ方法である。

【0008】

この出願の第3の発明は、以下のヌクレオチド配列：

人工の共通スプライシング受容部位、

合成ストップ/スタート配列、

レポーター遺伝子としてのGal4 DNA結合領域-p53融合遺伝子、

薬剤耐性遺伝子、

キイロショウジョウバエの検出可能な表現型の遺伝子、および

合成スプライシング供与部位

をこの順序で有する組換え体プラスミドであるベクターA、およびpCasperhsのポリクローニング部位内にヒートショックプロモーターと結合したGal4活性化領域-ラージT抗原融合遺伝子を有するpCasperhs由来ベクターBを使用する方法であって、

(a) 白眼遺伝子を持たない別個のハエのゲノムにベクターAおよびベクターBをそれぞれ挿入し、

(b) 薬剤耐性であるベクターAの1次形質転換体を選択し、眼の色をもつベクターBの1次形質転換体を選択し、

(c) ベクターAの1次形質転換体を転移酵素発現系統と交配してベクターを他の位置に転移させ、

(d) 眼の色が濃いハエを採集することによりベクターAの2次形質転換体を選択し、

(e) この2次形質転換体をベクターBの1次形質転換体と交配してベクターAとベクターBの両者を有するハエを産出させ、

(f) ステップ(e)で得たハエをUAS-ルシフェラーゼ含有系統と交配して、その結果産出したハエにおけるレポーター遺伝子の発現を測定し、

(g) トラップされた遺伝子をクローニングにより同定し、レポーター遺伝子およびハエの検出可能な表現型の遺伝子と融合したcDNA群の配列を決定する、ことからなるキイロショウジョウバエの未知遺伝子のトラップ方法である。

【0009】

第2および第3発明の実施態様は第1発明の実施態様に対応するものであり、これらについては以下の記載でさらに詳細に説明する。

【0010】

【発明の実施の形態】

この発明のベクター構築体は、例えば、一般的に使用されるPエレメント形質転換ベクターであるpCasper3 (Pirota, Vectors: A survey of molecular cloning vectors and their uses, eds. Rodriguez, R.L. & Denhardt, D.T., Butterworths, Boston. 437-456, 1998) および簡便なGal4-UAS発現系 (Brand and Perrimon, Development, 118:401-415, 1993) に基づいて構築することができる。

【0011】

すなわち、プロモーターのないGal4遺伝子がpCasper3のポリクローニング部位に挿入した。このGal4遺伝子の上流には人工の共通スプライシング受容部位および合成ストップ/スタート配列が配置されており、トラップされた遺伝子上流のエキソン(群)から始まりGal4の適切なリーディングフレームに至る翻訳を支配している。

【0012】

ミニ白眼遺伝子は、その3' UTR (非翻訳領域) 全部を除去し、人工のスプライシング供与部位を置き換えることによって、それ自身のポリアデニル化部位をもたない断片化遺伝子とした。

遺伝子トラップ現象が生じない場合には、この断片化ミニ白眼遺伝子は目の色

を付与しないと考えられる。そこで、この発明では、抗生物質による 1 次形質転換体の選択を補助するためにヒートショックプロモーターを結合したネオマイシン-ホスホトランスフェラーゼ (hs-neo) 遺伝子を挿入した。

【0013】

図 1 はジーントラップ構築体 (pTrap-hsne) の概略地図であり、配列番号 1 は pTrap-hsne ベクターの全ヌクレオチド配列である。

別のジーントラップ構築体である pTrap-G4-p53 (図 2) は、プラスミド pTrap-hsne の Gal4 コード化配列を Gal4 DNA 結合領域-p53 融合遺伝子 (Clontech 社製、Matchmaker Two Hybrid System, #K1605-1) で置き換えることにより作り出した。この構築体が、ヒートショックプロモーターを結合した Gal4 活性化領域-ラージ T 抗原を含有する別のベクター pCasperhs-G4-LT (図 3) と同じハエのゲノム中に共存すると、機能性 Gal4 分子のアセンブリーは、p53-ラージ T 抗原相互作用を通じて、外部からのヒートショックにより調節することができる。

【0014】

このようにして、Gal4 活性の意図的な時間的制御が可能になる。換言すると、トラップされた遺伝子のプロモーターによって空間的に決定されているパターンでの Gal4 の発現を、いまや外部ヒートショックにより任意の段階で誘導することが可能となる。

Gal4 発現の検出を容易にするために、別の構築体においては、Gal4 遺伝子を Gal4-ほたるルシフェラーゼ融合遺伝子に置き換えて pTrap-G4-luc (図 4) を得た。この人工遺伝子は、両酵素活性が保存された融合ポリペプチドをコード化している。

【0015】

ルシフェラーゼ活性の測定はルミノアッセイにより容易に行うことができるため (Brandes et al., Neuron, 16:687-694, 1996)、個々の生きたハエにおける Gal4 を容易に検出することができる。

次に、このベクター系を用いる遺伝子トラップ法である第 2 および第 3 発明の最良の形態を詳細に説明する。

(1) スクリーニング：

ジーントラップ構築体は、顕微注入により白眼遺伝子を持たないハエのゲノムに導入することができる。1次形質転換体の選択は、h s - n e o 遺伝子により付与されたネオマイシン類似体 G 4 1 8 耐性を使用して行うことが可能である。

(ただし、これらの構築体を用いて形質転換実験を実施する場合、断片化ミニ白眼遺伝子は、一般に、ほとんどの場合 w - 表現型と区別できる極めて僅かに黄色の眼を生じることになるので、G 4 1 8 による選択は不必要となる。)

ジーントラップ構築体を有する系統の樹立後、デルタ 2 - 3 遺伝因子を発現する転移酵素を含有するジャンプスターターと呼ばれる系統と交配することにより、通常の方法で2次形質転換体を作成することができる。

【0016】

通常、2次形質転換体の4から8パーセントは、祖先のハエに比較して極めて濃い目の色(濃橙色または赤色)をしている。このことは、構築体がプロモーターの下流に挿入され、ミニ白眼遺伝子が、除去された遺伝子の代わりにその遺伝子の転写「促進要素」(例えばポリアデニル化部位および転写ターミネーター)を使用していることを示している。これらは、遺伝子トラップ現象の最も有望な候補である可能性が極めて高い。これらの系統の場合、ベクターはおそらく遺伝子のイントロン内かまたは最初のイントロンの上流へ、適切な配向(すなわち転写方向が「トラップされた遺伝子」と、またミニ白眼遺伝子(およびGal4)とも同じ)で5' UTR内に挿入されている。ミニ白眼遺伝子はそれ自身のプロモーターをもち、それゆえその発現パターンはトラップされた遺伝子のそれと全く異なると思われる。

【0017】

これらの陽性系統は、次の段階で、UAS-ルシフェラーゼレポーター遺伝子構築体を保有する「マーカー」系統と交配することにより検査される。(pTrap-G4-lucベクターを使用する場合、この段階は不必要である。)通常、極めて強い相関性が、目の色とGal4発現の間に見られる：目の色が濃い系統の90%以上が、ルミノメーターを用いるルシフェラーゼアッセイでGal4を発現していることが証明されている(Brandes et al., Neuron, 16:687-692, 1996)。

(2) クローニング:

ジーントラップ構築体を内在性遺伝子のイントロン内に挿入する場合、構築体のマーカー遺伝子は、人工のスプライシング受容および付与部位を使用して mRNA レベルでスプライシングされ、トラップされた遺伝子のエキソンになると思われる。さらに正確に述べると、Gal4 の mRNA は挿入部位の上流に位置するエキソン (群) に連結されるはずであるが、同時にミニ白眼遺伝子の mRNA が続くエキソン (群) に融合してトラップされた遺伝子の 2 重標的化を達成している (図 5)。

【0018】

この特徴は、3' および 5' RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends: cDNA 末端の急速増幅) 法により、トラップされた遺伝子を迅速かつ容易に同定するのに使用することができる。捕獲した mRNA の一部分のみのクローニングおよび配列決定でさえも、BDGP (Berkeley Drosophila Genome Project) EST (Expressed Sequence Tag) ライブラリー中から高い確率で相同的な mRNA を見出すことが可能である。

【0019】

すでにクローニングされている遺伝子の同定は、同様のエンハンサートラップ構築体により作り出された突然変異を分析する際には通常は平均して 1 年以上の期間を要するのに対して、この発明の方法の場合には 1 週間未満で遺伝子の同定が可能となる場合もある。

P エlement ベクターは、活性遺伝子の 5' UTR または近傍に組み込まれる傾向があることが文献上周知であり、またこの発明者も経験した。(この発明者は、これらの場合に、もしベクターが最初のイントロンの上流に挿入され、それ故人工のスプライシング受容部位が使用できないならば、Gal4 遺伝子は近くのプロモーターから読み通し転写により発現されることを見出している。)

この傾向の利点は、逆転写 PCR もしくは vectorette PCR によって、または適当な制限消化によって構築体のネオマイシン耐性遺伝子を回収するプラスミドレスキューによって、挿入部位のフランキングゲノム配列のクローニングと配列決定により利用することができる。この場合も BDGP ライブラリーを検索して

意味のある一致があるかどうかを調べることができる。

(3) レスキュー：

観察された突然変異の表現型が実際に P エlement 挿入の結果起こったことを確認するただ一つの信頼できる方法は、特定の表現型をレスキューすることである。予期されることは、表現型（野生型のハエとの何かの差異）が P エlement の挿入により散布された遺伝子（群）の発現変化によって起こったということである。レスキューは、疑いのある遺伝子の cDNA を、その遺伝子自身と同じ空間的および時間的パターンで最も好ましく発現することによりなされる。

【0020】

予期されたように、第 1 発明のベクター構築体は通常、強い表現型を引き起こす。トラップされた遺伝子は mRNA レベルで 2 個の部分に分離し、多くの場合無効変異をもたらすと思われるので、これは全く意外ではない。したがって、この方法で得た突然変異はしばしばホモ接合性の致死性または不稔性を示す。低次形態の突然変異は、遺伝子トラップ P エlement 構築体の不正確な切除により得ることができる。

【0021】

上記のように、Gal 4 の発現は、単に Gal 4 遺伝子がそれ自身のプロモーターをもたず共通の融合 mRNA を共有するという理由から、トラップされた遺伝子のそれを正確に反映せざるを得ない。

この同一発現は、トラップされた遺伝子の UAS 結合クローン cDNA を保有する別のハエとこのハエとを交配することにより、突然変異の表現型をレスキューすることを可能とする。

【0022】

このようにして、元のホモ接合性無効変異遺伝子をトラップしたハエ、または無効変異アレル上にある種の低次形態アレルをもったハエのトランスヘテロ接合体をレスキューすることができる。

(4) トラップされた遺伝子の空間的および発生的発現パターンの測定：

トラップされた遺伝子の空間的および時間的に制御された発現の組織化学的測定もまた、同じハエのゲノムに UAS-1acZ 構築体を導入し、ベクターガラ

クトシダーゼに対する X-gal または抗体染色を実施することにより、容易に行うことができる。

(5) モザイク分析：

種々の、特徴的な、そして pTrap-G4-p53/pCasperhs-G4-TL ベクター系の場合には誘導可能な Gal4 発現パターンを持つような、ハエ系統の膨大なコレクションを保有することは、種々の Gal4 発現パターンをもった突然変異のバックグラウンド上にそれらの UAS 構築体を発現させることにより、対象となる全ての遺伝子のモザイク分析を実行可能にする。

【0023】

この方法は、どこでいつ、特定遺伝子の発現が突然変異表現型のレスキューのために必要とされるかという問題に回答を与えるものである。

同様に、任意の遺伝子を種々の異所性パターンで発現させて新規な優生表現型を生じさせることができる。この方法は、その特定遺伝子の役割を決定し、それが関与する経路を同定する助けとなるかもしれない。

【0024】

【実施例】

以下の実施例は、この発明の種々の特徴に関する具体的実施態様を説明するものである。この実施例は、いかなる意味でもこの発明の限定を意図するものではない。

図6は、aop-Gal4 および m-white-aop 融合 mRNA の RT-PCR 産物の配列決定結果を示す。

【0025】

鋳型は、公知の aop (anterior open/pokkuri/yan) 発生遺伝子の最初のイントロン中に組み込んだベクター pTrap-hsneo を有する陽性遺伝子トラップ系統から調製した全 RNA を用いた。この配列から、両方のスプライシングが正確に、予期された場所である人工調節配列の特定のヌクレオチドで生じたことが確認された。

【0026】

図7では、陽性遺伝子トラップ系統と UAS-lacZ 構築体を含有するハエ

とを交配して得たハエの脳の種々の部分における特徴的なベクターガラクトシダーゼ染色パターン像を示す。

【0027】

【発明の効果】

この発明のベクター系は、観察された表現型の原因となる遺伝子を容易かつ迅速にクローニングすることを可能とする。さらに、関心がある任意の遺伝子のUAS由来のコード配列を使用することにより、その特定の遺伝子を、トラップされた遺伝子と同一のパターンで発現させることができ、これらの発現は希望する任意の発生段階に時間的に調節することができる。

【0028】

【配列表】

配列番号：1

配列の長さ：11206塩基対

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：環状

配列の種類：DNA

配列の特徴：

存在位置 ：配列の種類

0001-0237：3' P配列

0238-0274：合成スプライシング受容部位および
ストップ/スタート配列

0275-3164：Gal4遺伝子（コード化領域および3' UTR）

3165-3426：hsp70ターミネーター

3427-3457：合成連結配列

3458-4907：コンプレメンター鎖上のヒートショックプロモーター
結合ネオマイシン耐性遺伝子

4908-8275：ミニ白眼遺伝子

8276-8299：合成スプライシング供与部位

8300-8446: 5' P配列

8447-11206: 完全pUC8配列を含むpCasper3シャトルベクターの
細菌性部分

0238-0274: 合成DNA

3427-3457: 合成DNA

4908-4914: 合成DNA

8276-8229: 合成DNA

配列:

CATGATGAAA TAACATAAGG TGGTCCCGTC GGCAAGAGAC ATCCACTTAA CGTATGCTTG	60
CAATAAGTGC GAGTGAAAGG AATAGTATTC TGAGTGTCGT ATTGAGTCTG AGTGAGACAG	120
CGATATGATT GTTGATTAAC CCTTAGCATG TCCGTGGGGT TTGAATTAAC TCATAATATT	180
AATTAGACGA AATTATTTTT AAAGTTTTAT TTTTAATAAT TTGCGAGTAC GCAAAGCTCT	240
TTCTCTTACA GGTGCAATTG ATGTGATGGA TCCAATGAAG CTACTGTCTT CTATCGAACA	300
AGCATGCGAT ATTTGCCGAC TTA AAAAGCT CAAGTGCTCC AAAGAAAAAC CGAAGTGCGC	360
CAAGTGCTCTG AAGAACAACCT GGGAGTGTCG CTACTCTCCC AAAACCAAAA GGTCTCCGCT	420
GACTAGGGCA CATCTGACAG AAGTGGAATC AAGGCTAGAA AGACTGGAAC AGCTATTTCT	480
ACTGATTTTT CCTCGAGAAG ACCTTGACAT GATTTTGAAA ATGGATTCTT TACAGGATAT	540
AAAAGCATTG TTAACAGGAT TATTTGTACA AGATAATGTG AATAAAGATG CCGTCACAGA	600
TAGATTGGCT TCAGTGAGAG CTGATATGCC TCTAACATTG AGACAGCATA GAATAAGTGC	660
GACATCATCA TCGGAAGAGA GTAGTAACAA AGGTCAAAGA CAGTTGACTG TATCGATTGA	720
CTCGGCAGCT CATCATGATA ACTCCACAAT TCCGTTGGAT TTTATGCCCA GGGATGCTCT	780
TCATGGATTT GATTGGTCTG AAGAGGATGA CATGTGCGAT GGCTTGCCCT TCCTGAAAAC	840
GGACCCCAAC AATAATGGGT TCTTTGGCGA CGGTTCTCTC TTATGTATTC TTCGATCTAT	900
TGGCTTTAAA CCGGAAAATT ACACGAACTC TAACGTTAAC AGGCTCCCGA CCATGATTAC	960
GGATAGATAC ACGTTGGCTT CTAGATCCAC AACATCCCGT TTA CTTCAAA GTTATCTCAA	1020
TAATTTTCAC CCCTACTGCC CTATCGTGCA CTCACCGACG CTAATGATGT TGTATAATAA	1080
CCAGATTGAA ATCGCGTCGA AGGATCAATG GCAAATCCTT TTAACTGCA TATTAGCCAT	1140
TGGAGCCTGG TGTATAGAGG GGGAATCTAC TGATATAGAT GTTTTTTACT ATCAAAATGC	1200
TAAATCTCAT TTGACGAGCA AGGTCTTCGA GTCAGGTTCC ATAATTTTGG TGACAGCCCT	1260

ACATCTTCTG TCGCGATATA CACAGTGGAG GCAGAAAACA AATACTAGCT ATAATTTTCA	1320
CAGCTTTTCC ATAAGAATGG CCATATCATT GGGCTTGAAT AGGGACCTCC CCTCGTCCTT	1380
CAGTGATAGC AGCATTCTGG AACAAAGACG CCGAATTTGG TGGTCTGTCT ACTCTTGGGA	1440
GATCCAATTG TCCCTGCTTT ATGGTCGATC CATCCAGCTT TCTCAGAATA CAATCTCCTT	1500
CCCTTCTTCT GTCGACGATG TGCAGCGTAC CACAACAGGT CCCACCATAT ATCATGGCAT	1560
CATTGAAACA GCAAGGCTCT TACAAGTTTT CACAAAAATC TATGAACTAG AAAAAACAGT	1620
AACTGCAGAA AAAAGTCCTA TATGTGCAAA AAAATGCTTG ATGATTTGTA ATGAGATTGA	1680
GGAGGTTTCG AGACAGGCAC CAAAGTTTTT ACAAATGGAT ATTTCCACCA CCGCTCTAAC	1740
CAATTTGTTG AAGGAACACC CTTGGCTATC CTTTACAAGA TTCGAACTGA AGTGGAACA	1800
GTTGTCTCTT ATCATTTATG TATTAAGAGA TTTTTCCTACT AATTTTACCC AGAAAAAGTC	1860
ACAAC TAGAA CAGGATCAAA ATGATCATCA AAGTTATGAA GTTAAACGAT GCTCCATCAT	1920
GTAAAGCGAT GCAGCACAAA GAACTGTTAT GTCTGTAAGT AGCTATATGG ACAATCATAA	1980
TGTCACCCCA TATTTTGCCT GGAATTGTTT TTATTACTTG TTCAATGCAG TCCTAGTACC	2040
CATAAAGACT CTACTCTCAA ACTCAAAATC GAATGCTGAG AATAACGAGA CCGCACAAAT	2100
ATTACAACAA ATTAACACTG TTCTGATGCT ATTAACAAAA CTGGCCACTT TTAACATCCA	2160
GACTTG TGAA AAATACATTC AAGTACTGGA AGAGGTATGT GCGCCGTTTC TGTTATCACA	2220
GTGTGCAATC CCATTACCGC ATATCAGTTA TAACAATAGT AATGGTAGCG CCATTAAAAA	2280
TATTGTCCGT TCTGCAACTA TCGCCCAATA CCCTACTCTT CCGGAGGAAA ATGTCAACAA	2340
TATCAGTGTT AAATATGTTT CTCCTGGCTC AGTAGGGCCT TCACCTGTGC CATTGAAATC	2400
AGGAGCAAGT TTCAGTGATC TAGTCAAGCT GTTATCTAAC CGTCCACCCT CTCGTAAGTC	2460
TCCAGTGACA ATACCAAGAA GCACACCTTC GCATCGCTCA GTCACGCCTT TTCTAGGGCA	2520
ACAGCAACAG CTGCAATCAT TAGTGCCACT GACCCCGTCT GCTTTGTTTG GTGGCGCCAA	2580
TTTTAATCAA AGTGGAATA TTGCTGATAG CTCATTGTCC TTCACCTTCA CTAACAGTAG	2640
CAACGGTCCG AACCTCATAA CAACTCAAAC AAATTCTCAA GCGCTTTCAC AACCAATTGC	2700
CTCCTCTAAC GTTCATGATA ACTTCATGAA TAATGAAATC ACGGCTAGTA AAATTGATGA	2760
TGGTAATAAT TCAAAACCAC TGTCACCTGG TTGGACGGAC CAAACTGCGT ATAACGCGTT	2820
TGGAATCACT ACAGGGATGT TTAATACCAC TACAATGGAT GATGTATATA ACTATCTATT	2880
CGATGATGAA GATACCCAC CAAACCCAAA AAAAGAGTAA AATGAATCGT AGATACTGAA	2940
AAACCCCGCA AGTTCCTTC AACTGTGCAT CGTGCACCAT CTCAATTTCT TTCATTTATA	3000

CATCGTTTTG CCTTCTTTTA TGTAACATA CTCCTCTAAG TTTCAATCTT GGCCATGTAA	3060
CCTCTGATCT ATAGAATTTT TTAAATGACT AGAATTAATG CCCATCTTTT TTTTGGACCT	3120
AAATTCTTCA TGAAAATATA TTACGAGGGC TTATTGAGAA GCTTATCGAT ACCGTCGACT	3180
AAAGCCAAAT AGAAATTATT CAGTTCTGGC TTAAGTTTTT AAAAGTGATA TTATTTATTT	3240
GGTTGTAACC AACCAAAAGA ATGTAAATAA CTAATACATA ATTATGTTAG TTTTAAGTTA	3300
GCAACAAATT GATTTTAGCT ATATTAGCTA CTTGGTTAAT AAATAGAATA TATTTATTTA	3360
AAGATAATTC GTTTTTATTG TCAGGGAGTG AGTTTGCTTA AAAACTCGTT TAGATCCACT	3420
AGAAGGACCG CGGCTCCTCG ACCGGATCGA AAGGAGGGCG AAGAACTCCA GCATGAGATC	3480
CCCGCGCTGG AGGATCATCC AGCCGGCGTC CCGGAAAACG ATTCCGAAGC CCAACCTTTC	3540
ATAGAAGGCG GCGGTGGAAT CGAAATCTCG TGATGGCAGG TTGGGCGTCG CTTGGTCGGT	3600
CATTTGGAAC CCCAGAGTCC CGCTCAGAAG AACTCGTCAA GAAGGCGATA GAAGGCGATG	3660
CGCTGCGAAT CGGGAGCGGC GATACCGTAA AGCACGAGGA AGCGGTCAGC CCATTCGCGG	3720
CCAAGCTCTT CAGCAATATC ACGGGTAGCC AACGCTATGT CCTGATAGCG GTCCGCCACA	3780
CCCAGCCGGC CACAGTCGAT GAATCCAGAA AAGCGGCCAT TTTCCACCAT GATATTCGGC	3840
AAGCAGGCAT CGCCATGGGT CACGACGAGA TCCTCGCCGT CGGGCATGCG CGCCTTGAGC	3900
CTGGCGAACA GTTCGGCTGG CGCGAGCCCC TGATGCTCTT CGTCCAGATC ATCCTGATCG	3960
ACAAGACCGG CTTCCATCCG AGTACGTGCT CGCTCGATGC GATGTTTCGC TTGGTGGTCG	4020
AATGGGCAGG TAGCCGGATC AAGCGTATGC AGCCGCCGCA TTGCATCAGC CATGATGGAT	4080
ACTTTCTCGG CAGGAGCAAG GTGAGATGAC AGGAGATCCT GCGCCGGCAC TTCGCCCAAT	4140
AGCAGCCAGT CCCTTCCCGC TTCAGTGACA ACGTCGAGCA CAGCTGCGCA AGGAACGCCC	4200
GTCGTGGCCA GCCACGATAG CCGCGCTGCC TCGTCTGCA GTTCATTGAG GGCACCGGAC	4260
AGGTCGGTCT TGACAAAAAG AACCGGGCGC CCCTGCGCTG ACAGCCGGAA CACGGCGGCA	4320
TCAGAGCAGC CGATTGTCTG TTGTGCCCAG TCATAGCCGA ATAGCCTCTC CACCCAAGCG	4380
GCCGGAGAAC CTGCGTGCAA TCCATCTTGT TCAATCATGC GAAACGATCC TCATCCTGTC	4440
TCTTGATCAG ATCCCCTATT CAGAGTTCTC TTCTTGATTT CAATAATTAC TTCTTGGCAG	4500
ATTTGAGTAG TTGCAGTTGA TTTACTTGGT TGCTGGTTAC TTTTAATTGA TTCACTTTAA	4560
CTTGCACTTT ACTGCAGATT GTTTAGCTTG TTCAGCTGCG CTTGTTTATT TGCTTAGCTT	4620
TCGCTTAGCG ACGTGTTTAC TTTGCTTGTT TGAATTGAAT TGTCGCTCCG TAGACGAAGC	4680
GCCTCTATTT ATACTCCGGC GCTCTTTTCG CGAACATTCG AGGCGCGCTC TCTCGAACCA	4740

ACGAGAGCAG	TATGCCGTTT	ACTGTGTGAC	AGAGTGAGAG	AGCATTAGTG	CAGAGAGGGA	4800
GAGACCCAAA	AAGAAAAGAG	AGAATAACGA	ATAACGGCCA	GAGAAATTTT	TCGAGTTTTT	4860
TTTCTGCCAA	ACAAATGACC	TACCACAATA	ACCAGTTTGT	TTTGGGATCT	AGTCCCTAAT	4920
TCTAGTATGT	ATGTAAGTTA	ATAAAACCCT	TTTTTGGAGA	ATGTAGATTT	AAAAAAACAT	4980
ATTTTTTTTT	TATTTTTTAC	TGCACTGGAC	ATCATTGAAC	TTATCTGATC	AGTTTTAAAT	5040
TTACTTCGAT	CCAAGGGTAT	TTGAAGTACC	AGGTTCTTTC	GATTACCTCT	CACTCAAAAT	5100
GACATTCCAC	TCAAAGTCAG	CGCTGTTTGC	CTCCTTCTCT	GTCCACAGAA	ATATCGCCGT	5160
CTCTTTCGCC	GCTGCGTCCG	CTATCTCTTT	CGCCACCGTT	TGTAGCGTTA	CCTAGCGTCA	5220
ATGTCCGCCT	TCAGTTGCAC	TTTGTGAGCG	GTTTCGTGAC	GAAGCTCCAA	GCGGTTTACG	5280
CCATCAATTA	AACACAAAAGT	GCTGTGCCAA	AACTCCTCTC	GCTTCTTATT	TTTGTTTGTT	5340
TTTTGAGTGA	TTGGGGTGGT	GATTGGTTTT	GGGTGGGTAA	GCAGGGGAAA	GTGTGAAAAA	5400
TCCCGGCAAT	GGGCCAAGAG	GATCAGGAGC	TATTAATTCG	CGGAGGCAGC	AAACACCCAT	5460
CTGCCGAGCA	TCTGAACAAT	GTGAGTAGTA	CATGTGCATA	CATCTTAAGT	TCACTTGATC	5520
TATAGGAACT	GCGATTGCAA	CATCAAATTG	TCTGCGGCGT	GAGAACTGCG	ACCCACAAAA	5580
ATCCCAAACC	GCAATCGCAC	AAACAAATAG	TGACACGAAA	CAGATTATTC	TGGTAGCTGT	5640
GCTCGCTATA	TAAGACAATT	TTTAAGATCA	TATCATGATC	AAGACATCTA	AAGGCATTCA	5700
TTTTCGACTA	CATTCTTTTT	TACAAAAAAT	ATAACAACCA	GATATTTTAA	GCTGATCCTA	5760
GATGCACAAA	AAATAAATAA	AAGTATAAAC	CTACTTCGTA	GGATACTTCG	TTTTGTTCGG	5820
GGTTAGATGA	GCATAACGCT	TGTAGTTGAT	ATTTGAGATC	CCCTATCATT	GCAGGGTGAC	5880
AGCGGACGCT	TCGCAGAGCT	GCATTAACCA	GGGCTTCGGG	CAGGCCAAAA	ACTACGGCAC	5940
GCTCCTGCCA	CCCAGTCCGC	CGGAGGACTC	CGGTTCAGGG	AGCGGCCAAC	TAGCCGAGAA	6000
CCTCACCTAT	GCCTGGCACA	ATATGGACAT	CTTTGGGGCG	GTCAATCAGC	CGGGCTCCGG	6060
ATGGCGGCAG	CTGGTCAACC	GGACACGCGG	ACTATTCTGC	AACGAGCGAC	ACATACGGGC	6120
GCCCAGGAAA	CATTTGCTCA	AGAACGGTGA	GTTTCTATTC	GCAGTCGGCT	GATCTGTGTG	6180
AAATCTTAAT	AAAGGGTCCA	ATTACCAATT	TGAAACTCAG	TTTGCGGCGT	GGCCTATCCG	6240
GGCGAACTTT	TGGCCGTGAT	GGGCAGTTCC	GGTGCCGGAA	AGACGACCCT	GCTGAATGCC	6300
CTTGCCTTTC	GATCGCCGCA	GGGCATCCAA	GTATCGCCAT	CCGGGATGCG	ACTGCTCAAT	6360
GGCCAACCTG	TGGACGCCAA	GGAGATGCAG	GCCAGGTGCG	CCTATGTCCA	GCAGGATGAC	6420
CTCTTTATCG	GCTCCCTAAC	GGCCAGGGAA	CACCTGATTT	TCCAGGCCAT	GGTGCGGATG	6480

CCACGACATC	TGACCTATCG	GCAGCGAGTG	GCCCGCGTGG	ATCAGGTGAT	CCAGGAGCTT	6540
TCGCTCAGCA	AATGTCAGCA	CACGATCATC	GGTGTGCCCC	GCAGGGTGAA	AGGTCTGTCC	6600
GGCGGAGAAA	GGAAGCGTCT	GGCATTGCC	TCCGAGGCAC	TAACCGATCC	GCCGCTTCTG	6660
ATCTGCGATG	AGCCACCTC	CGGACTGGAC	TCATTTACCG	CCCACAGCGT	CGTCCAGGTG	6720
CTGAAGAAGC	TGTCGCAGAA	GGGCAAGACC	GTCATCCTGA	CCATTTCATCA	GCCGTCTTCC	6780
GAGCTGTTTG	AGCTCTTTGA	CAAGATCCTT	CTGATGGCCG	AGGGCAGGGT	AGCTTTCTTG	6840
GGCACTCCCA	GCGAAGCCGT	CGACTTCTTT	TCCTAGTGAG	TTCGATGTGT	TTATTAAGGG	6900
TATCTAGCAT	TACATTACAT	CTCAACTCCT	ATCCAGCGTG	GGTGCCCACT	GTCCTACCAA	6960
CTACAATCCG	GCGGACTTTT	ACGTACAGGT	GTTGGCCGTT	GTGCCCCGAC	GGGAGATCGA	7020
GTCCCGTGAT	CGGATCGCCA	AGATATGCGA	CAATTTTGCT	ATTAGCAAAG	TAGCCCGGGA	7080
TATGGAGCAG	TTGTTGGCCA	CCAAAAATTT	GGAGAAGCCA	CTGGAGCAGC	CGGAGAATGG	7140
GTACACCTAC	AAGGCCACCT	GGTTCATGCA	GTTCCGGGCG	GTCCTGTGGC	GATCCTGGCT	7200
GTCGGTGCTC	AAGGAACCAC	TCCTCGTAAA	AGTGCGACTT	ATTCAGACAA	CGGTGAGTGG	7260
TTCCAGTGGA	AACAAATGAT	ATAACGCTTA	CAATTCTTGG	AAACAAATTC	GCTAGATTTT	7320
AGTTAGAATT	GCCTGATTCC	ACACCCCTCT	TAGTTTTTTT	CAATGAGATG	TATAGTTTAT	7380
AGTTTTGCAG	AAAATAAATA	AATTTTCATT	AACTCGCGAA	CATGTTGAAG	ATATGAATAT	7440
TAATGAGATG	CGAGTAACAT	TTTAATTTGC	AGATGGTTGC	CATCTTGATT	GGCCTCATCT	7500
TTTTGGGCCA	ACAACCTCAG	CAAGTGGGCG	TGATGAATAT	CAACGGAGCC	ATCTTCCTCT	7560
TCCTGACCAA	CATGACCTTT	CAAAACGTCT	TTGCCACGAT	AAATGTAAGT	CTTGTTTAGA	7620
ATACATTTGC	ATATTAATAA	TTACTAACT	TTCTAATGAA	TCGATTCGAT	TTAGGTGTTT	7680
ACCTCAGAGC	TGCCAGTTTT	TATGAGGGAG	GCCCGAAGTC	GACTTTATCG	CTGTGACACA	7740
TACTTTCTGG	GCAAAACGAT	TGCCGAATTA	CCGCTTTTTT	TCACAGTGCC	ACTGGTCTTC	7800
ACGGCGATTG	CCTATCCGAT	GATCGGACTG	CGGGCCGGAG	TGCTGCACTT	CTTCAACTGC	7860
CTGGCGCTGG	TCACTCTGGT	GGCCAATGTG	TCAACGTCCT	TCGGATATCT	AATATCCTGC	7920
GCCAGCTCCT	CGACCTCGAT	GGCGCTGTCT	GTGGGTCCGC	CGGTTATCAT	ACCATTCCCTG	7980
CTCTTTGGCG	GCTTCTTCTT	GAACCTGGGC	TCGGTGCCAG	TATACCTCAA	ATGGTTGTCTG	8040
TACCTCTCAT	GGTTCCGTTA	CGCCAACGAG	GGTCTGCTGA	TTAACCAATG	GGCGGACGTG	8100
GAGCCGGGCG	AAATTAGCTG	CACATCGTCG	AACACCACGT	GCCCCAGTTC	GGGCAAGGTC	8160
ATCCTGGAGA	CGCTTAACTT	CTCCGCCGCC	GATCTGCCGC	TGGAACACGT	GGGTCTGGCC	8220

特平 1 0 — 1 4 1 9 5 2

ATTCTCATCG	TGAGCTTCCG	GGTGCTCGCA	TATCTGGCTC	TAAGACTTCG	GGCCCGACGC	8280
AAGGAGTAGA	AGGTAAGTAG	CGGCCGCACG	TAAGGGTTAA	TGTTTTCAAA	AAAAAATTCG	8340
TCCGCACACA	ACCTTTCCTC	TCAACAAGCA	AACGTGCACT	GAATTTAAGT	GTATACTTCG	8400
GTAAGCTTCG	GCTATCGACG	GGACCACCTT	ATGTTATTTT	ATCATGGGCC	AGACCCACGT	8460
AGTCCAGCGG	CAGATCGGCG	GCGGAGAAGT	TAAGCGTCTC	CAGGATGACC	TTGCCCCAAC	8520
TGGGGCACGT	GGTGTTTCGAC	GATGTGCAGC	TAATTTTCGCC	CGGCTCCACG	TCCGCCCATT	8580
GGTTAATCAG	CAGACCCTCG	TTGGCGTAAC	GGAACCATGA	GAGGTACGAC	AACCATTTGA	8640
GGTATACTGG	CACCGAGCCC	GAGTTCAAGA	AGAAGGCGTT	TTTCCATAGG	CTCCGCCCCC	8700
CTGACGAGCA	TCACAAAAAT	CGACGCTCAA	GTCAGAGGTG	GCGAAACCCG	ACAGGACTAT	8760
AAAGATACCA	GGCGTTTCCC	CCTGGAAGCT	CCCTCGTGCG	CTCTCCTGTT	CCGACCCTGC	8820
CGCTTACCGG	ATACCTGTCC	GCCTTTCTCC	CTTCGGGAAG	CGTGGCGCTT	TCTCAATGCT	8880
CACGCTGTAG	GTATCTCAGT	TCGGTGTAGG	TCGTTGCTC	CAAGCTGGGC	TGTGTGCACG	8940
AACCCCCCGT	TCAGCCCGAC	CGCTGCGCCT	TATCCGGTAA	CTATCGTCTT	GAGTCCAACC	9000
CGGTAAGACA	CGACTTATCG	CCACTGGCAG	CAGCCACTGG	TAACAGGATT	AGCAGAGCGA	9060
GGTATGTAGG	CGGTGCTACA	GAGTTCTTGA	AGTGGTGGCC	TAACTACGGC	TACACTAGAA	9120
GGACAGTATT	TGGTATCTGC	GCTCTGCTGA	AGCCAGTTAC	CTTCGGAAAA	AGAGTTGGTA	9180
GCTCTTGATC	CGGCAAACAA	ACCACCGCTG	GTAGCGGTGG	TTTTTTTGTT	TGCAAGCAGC	9240
AGATTACGCG	CAGAAAAAAA	GGATCTCAAG	AAGATCCTTT	GATCTTTTCT	ACGGGGTCTG	9300
ACGCTCAGTG	GAACGAAAAC	TCACGTTAAG	GGATTTTGGT	CATGAGATTA	TCAAAAAGGA	9360
TCTTCACCTA	GATCCTTTTA	AATTA AAAAT	GAAGTTT TAA	ATCAATCTAA	AGTATATATG	9420
AGTAAACTTG	GTCTGACAGT	TACCAATGCT	TAATCAGTGA	GGCACCTATC	TCAGCGATCT	9480
GTCTATTTTCG	TTCATCCATA	GTTGCCTGAC	TCCCCGTCGT	GTAGATAACT	ACGATACGGG	9540
AGGGCTTACC	ATCTGGCCCC	AGTGCTGCAA	TGATACCGCG	AGACCCACGC	TCACCGGCTC	9600
CAGATTTATC	AGCAATAAAC	CAGCCAGCCG	GAAGGGCCGA	GCGCAGAAGT	GGTCCTGCAA	9660
CTTTATCCGC	CTCCATCCAG	TCTATTAATT	GTTGCCGGGA	AGCTAGAGTA	AGTAGTTCCG	9720
CAGTTAATAG	TTGCGCAAC	GTTGTTGCCA	TTGCTACAGG	CATCGTGGTG	TCACGCTCGT	9780
CGTTTGGTAT	GGCTTCATT	AGCTCCGGTT	CCCAACGATC	AAGGCGAGTT	ACATGATCCC	9840
CCATGTTGTG	CAAAAAAGCG	GTTAGCTCCT	TCGGTCCTCC	GATCGTTGTC	AGAAGTAAGT	9900
TGGCCGCACT	GTTATCACTC	ATGGTTATGG	CAGCACTGCA	TAATTCTCTT	ACTGTCATGC	9960

CATCCGTAAG ATGCTTTTCT GTGACTGGTG AGTACTCAAC CAAGTCATTC TGAGAATAGT 10020
 GTATGCGGCG ACCGAGTTGC TCTTGCCCGG CGTCAACACG GGATAATACC GCGCCACATA 10080
 GCAGAACTTT AAAAGTGCTC ATCATTGGAA AACGTTCTTC GGGGCGAAAA CTCTCAAGGA 10140
 TCTTACCGCT GTTGAGATCC AGTTCGATGT AACCCACTCG TGCACCCAAC TGATCTTCAG 10200
 CATCTTTTAC TTTCACCAGC GTTTCTGGGT GAGCAAAAAC AGGAAGGCAA AATGCCGCAA 10260
 AAAAGGGAAT AAGGGCGACA CGGAAATGTT GAATACTCAT ACTCTTCCTT TTTCAATATT 10320
 ATTGAAGCAT TTATCAGGGT TATTGTCTCA TGAGCGGATA CATATTTGAA TGTATTTAGA 10380
 AAAATAAACA AATAGGGGTT CCGCGCACAT TTCCCCGAAA AGTGCCACCT GACGTCTAAG 10440
 AAACCATTAT TATCATGACA TTAACCTATA AAAATAGGCG TATCACGAGG CCCTTTCGTC 10500
 TCGCGCGTTT CGGTGATGAC GGTGAAAACC TCTGACACAT GCAGCTCCCG GAGACGGTCA 10560
 CAGCTTGTCT GTAAGCGGAT GCCGGGAGCA GACAAGCCCG TCAGGGCGCG TCAGCGGGTG 10620
 TTGGCGGGTG TCGGGGCTGG CTTAACTATG CGGCATCAGA GCAGATTGTA CTGAGAGTGC 10680
 ACCATATGCG GTGTGAAATA CCGCACCGAA TCGCGCGGAA CTAACGACAG TCGCTCCAAG 10740
 GTCGTGGAAC AAAAGGTGAA TGTGTTGCGG AGAGCGGGTG GGAGACAGCG AAAGAGCAAC 10800
 TACGAAACGT GGTGTGGTGG AGGTGAATTA TGAAGAGGGC GCGCGATTG AAAAGTATGT 10860
 ATATAAAAAA TATATCCCGG TGTTTTATGT AGCGATAAAC GAGTTTTTGA TGTAAGGTAT 10920
 GCAGGTGTGT AAGTCTTTTG GTTAGAAGAC AAATCCAAAG TCTACTTGTG GGGATGTTTCG 10980
 AAGGGGAAAT ACTTGATTTC TATAGGTCAT ATCTTGTTTT TATTGGCACA AATATAATTA 11040
 CATTAGCTTT TTGAGGGGGC AATAAACAGT AAACACGATG GTAATAATGG TAAAAAATAA 11100
 AACAAAGCAGT TATTTCCGAT ATATGTCGGC TACTCCTTGC GTCGGGCCCCG AAGTCTTAGA 11160
 GCCAGATATG CGAGCACCCG GAAGCTCACG ATGAGAATGG CCAGAC 11206

【図面の簡単な説明】

【図 1】

この発明のベクターである pTrap-hsneo の概略地図である。

【図 2】

この発明のベクターである pTrap-G4-p53 の概略地図である。

【図 3】

この発明のベクターである pCasperhs-G4-LT の概略地図である。

【図4】

この発明のベクターであるpTrap-G4-lucの概略地図である。

【図5】

クローニングのためにこの発明のベクターが挿入されたハエゲノムの概略図である。

【図6】

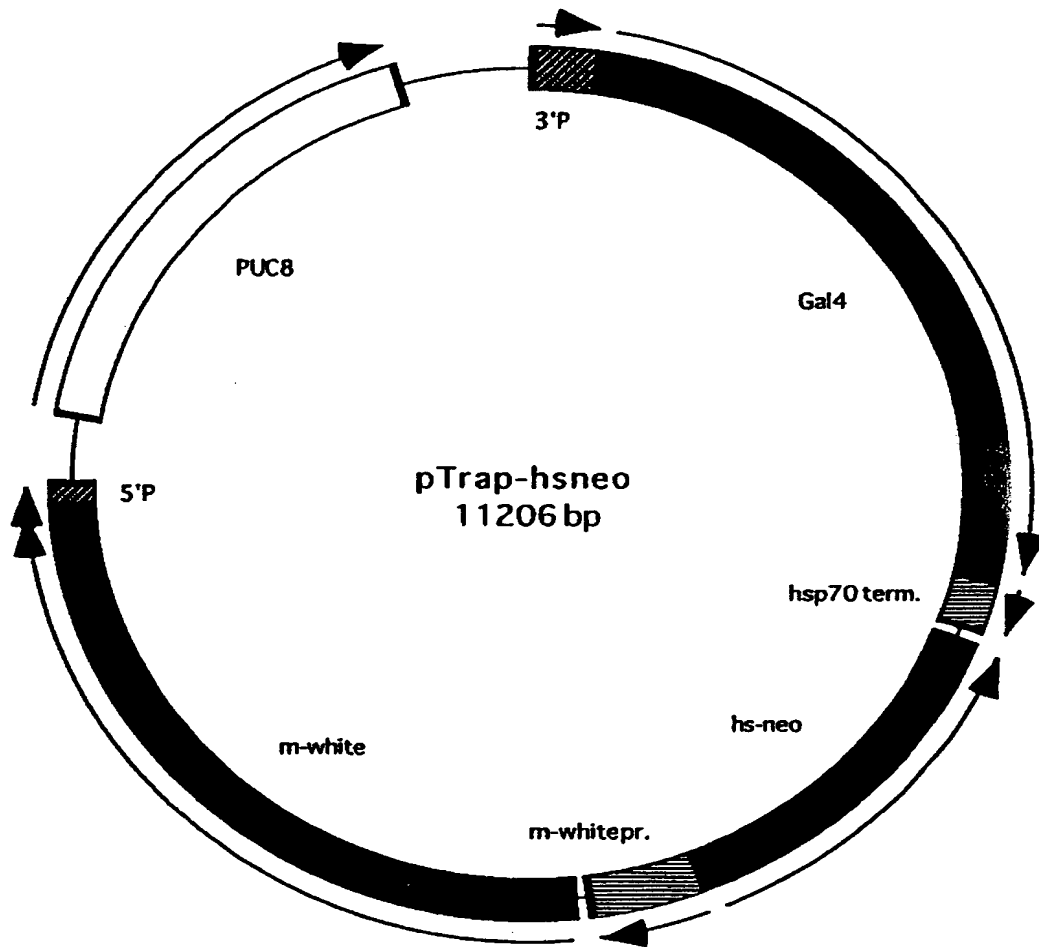
aop-Gal4 およびm-white-aop 融合mRNAのRT-PCR産物の配列決定結果である。

【図7】

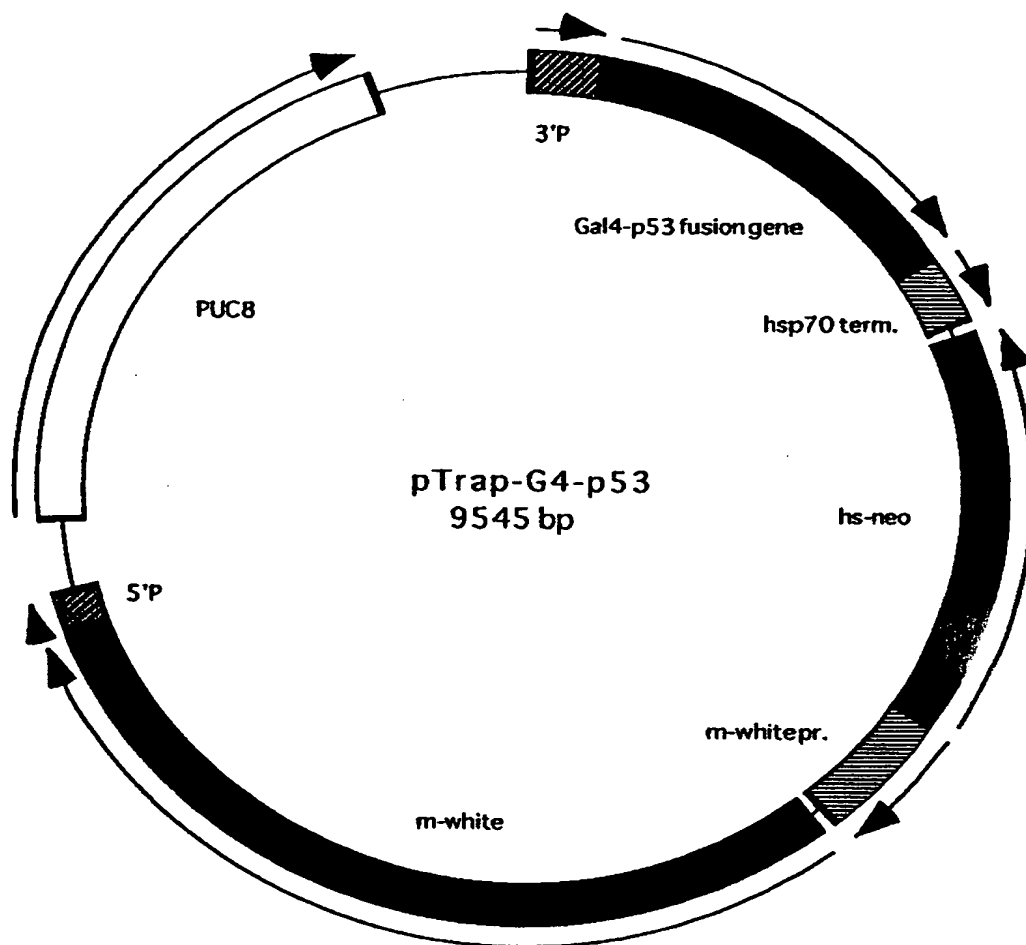
陽性遺伝子トラップ系統とUAS-lacZ構築体を含有するハエとを交配して得たハエ脳の種々の部分における特徴的なベクターガラクトシダーゼ染色パターン像である。

【書類名】 図面

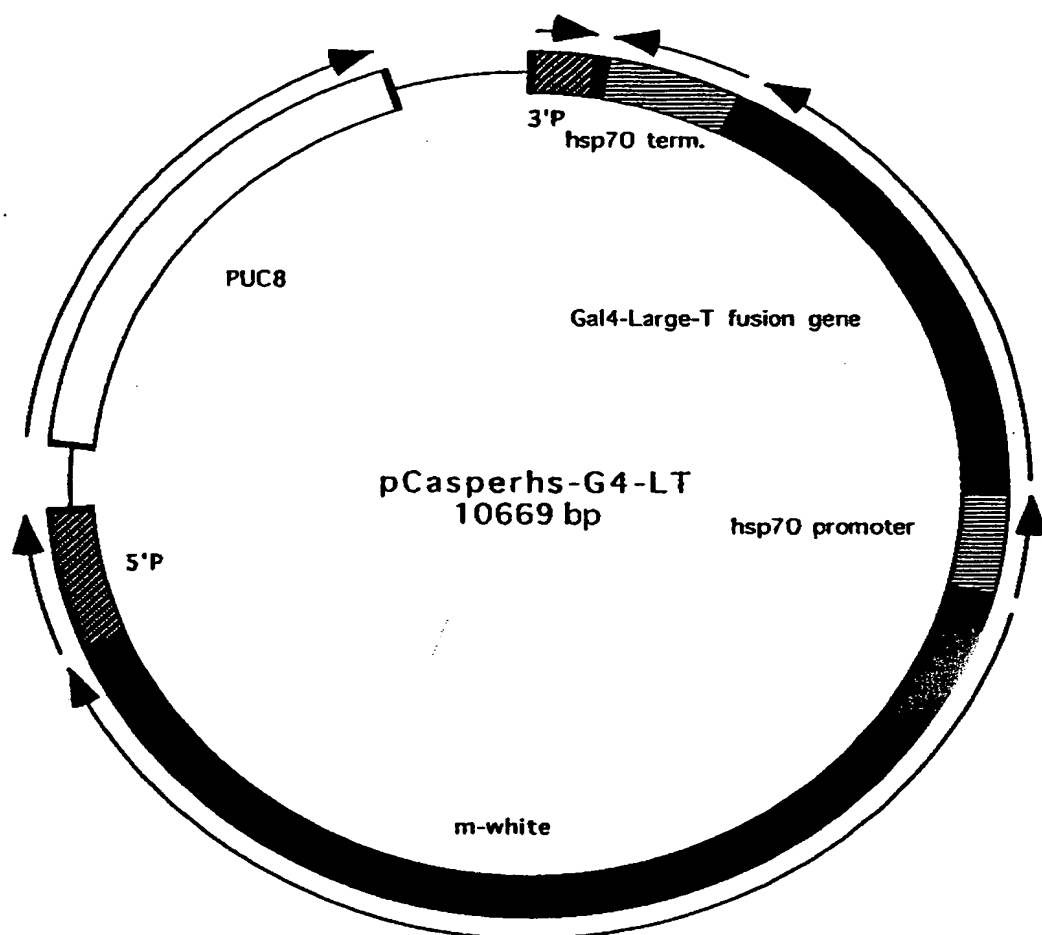
【図 1】



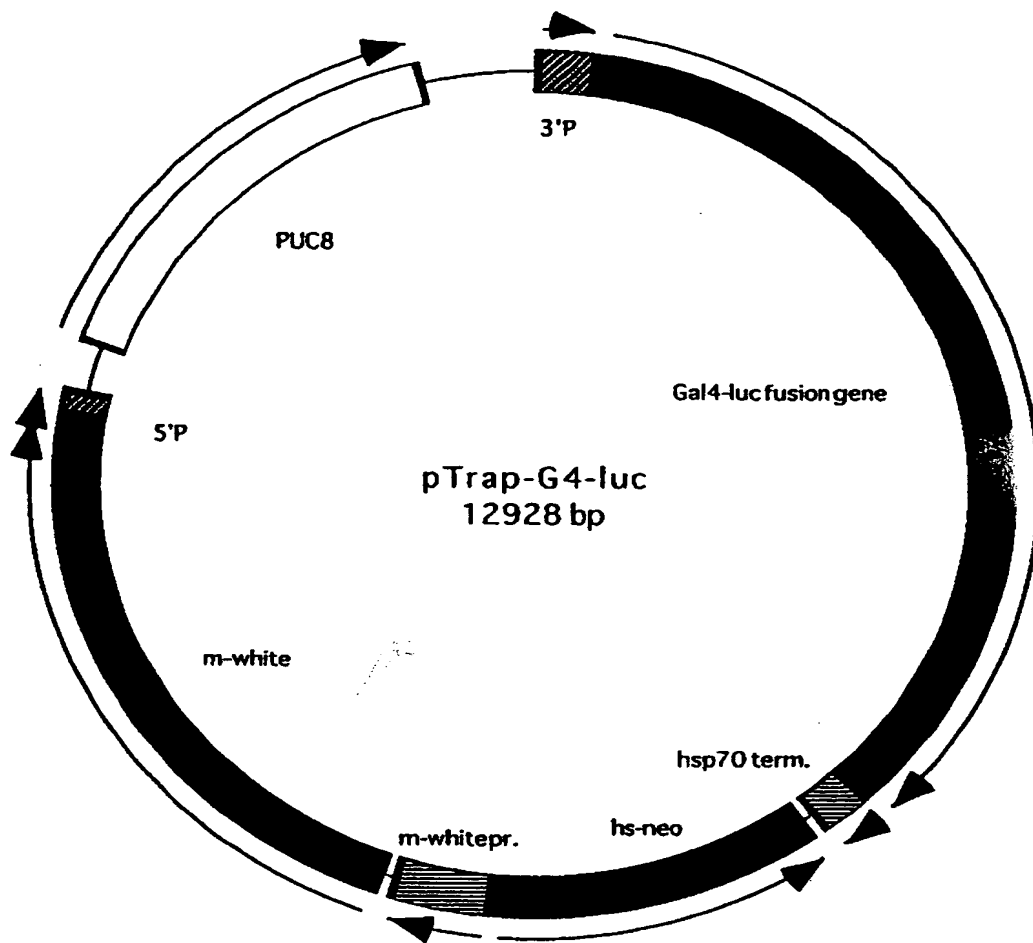
【図 2】



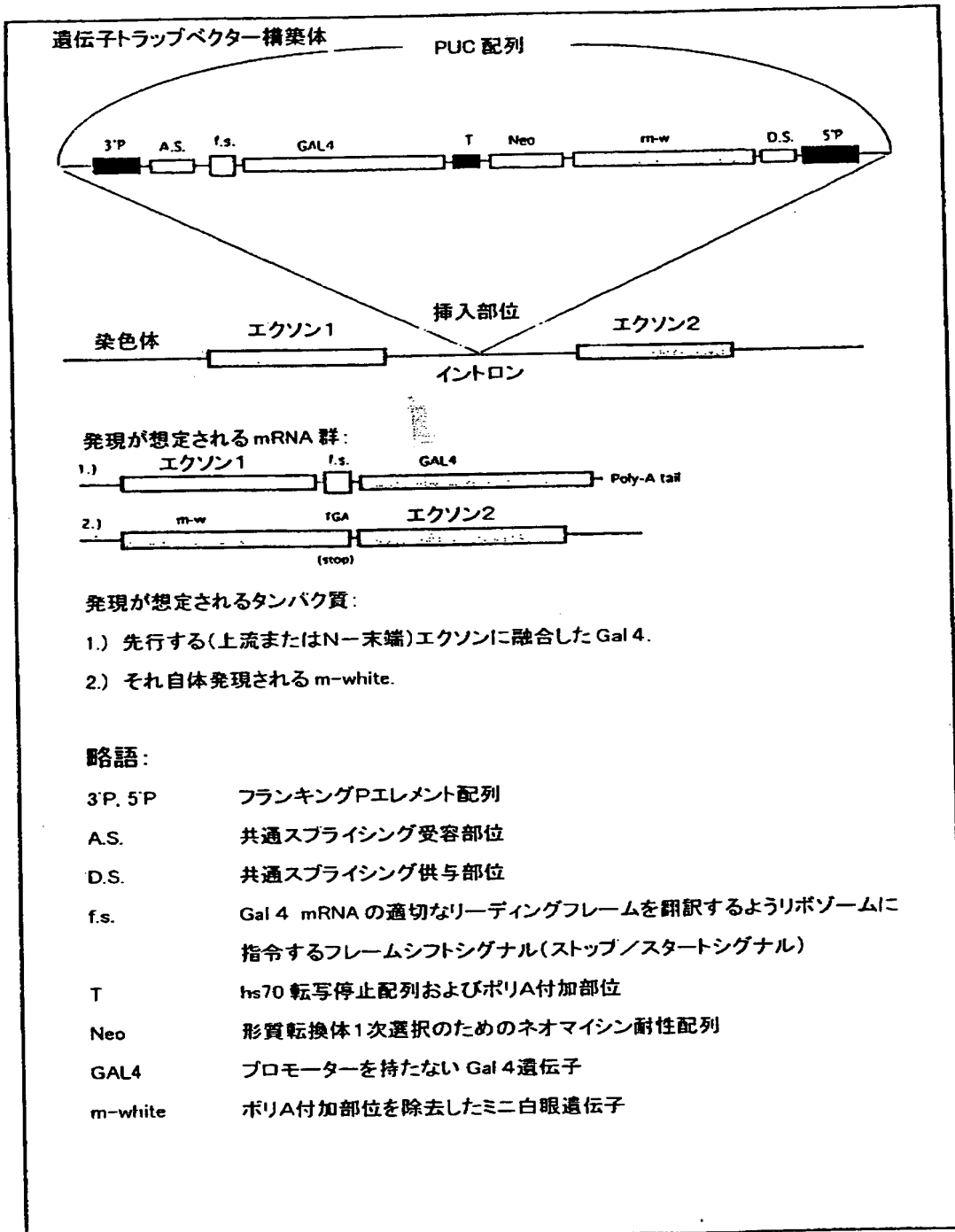
【図 3】



【図4】

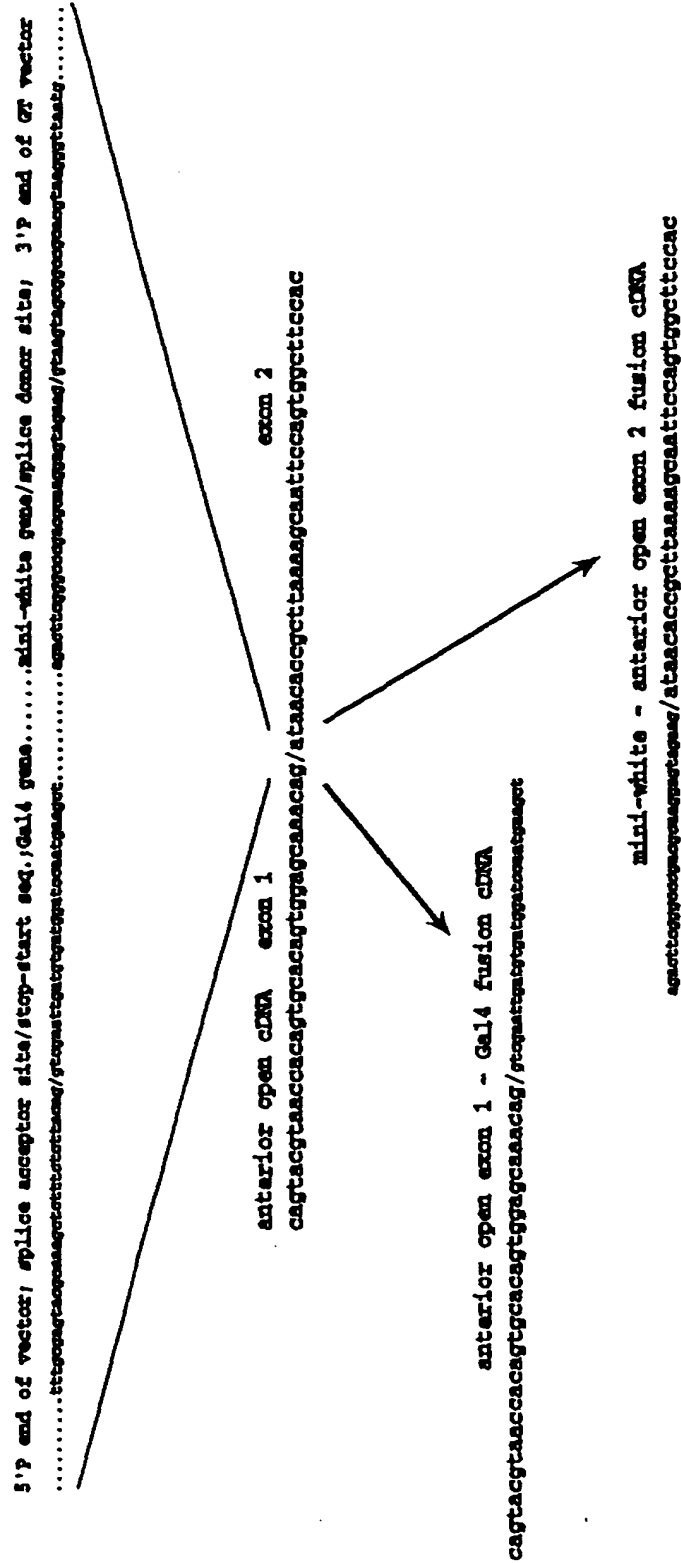


【図 5】



【図 6】

遺伝子トラップベクターから前方オープン遺伝子への Gal 4 およびミニ白眼遺伝子の正確なスプライシング



【図 7】

UAS-lac-Z レポーター構築体によって示された Gal 4 の発現パターン

A



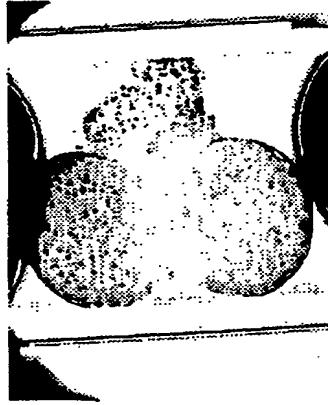
77系統成虫脳

B



49系統幼虫脳

C



6系統幼虫脳

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 キイロシヨウジョウバエの新規遺伝子のクローニングおよび機能分析を容易にする新規ベクター系、およびこのベクター系による遺伝子トラップ法を提供する。

【解決手段】

以下のヌクレオチド配列：人工の共通スプライシング受容部位、合成ストップ／スタート配列、レポーター遺伝子、薬剤耐性遺伝子、キイロシヨウジョウバエの検出可能な表現型の遺伝子、および合成スプライシング供与部位をこの順序で有する組換え体プラスミドであるキイロシヨウジョウバエの未知遺伝子トラップ用ベクター、およびベクターを使用するキイロシヨウジョウバエの未知遺伝子トラップ方法を提供する。

【選択図】 図 1

【書類名】 職権訂正データ
【訂正書類】 翻訳文提出書

<認定情報・付加情報>

【特許出願人】
【識別番号】 396020800
【住所又は居所】 埼玉県川口市本町4丁目1番8号
【氏名又は名称】 科学技術振興事業団
【代理人】 申請人
【識別番号】 100093230
【住所又は居所】 東京都渋谷区宇田川町37-10 麻仁ビル6階
西澤国際特許事務所
【氏名又は名称】 西澤 利夫

【書類名】 手続補正書

【提出日】 平成10年 8月 7日

【あて先】 特許庁長官殿

【事件の表示】

【出願番号】 平成10年特許願第141952号

【補正をする者】

【事件との関係】 特許出願人

【識別番号】 396020800

【氏名又は名称】 科学技術振興事業団

【代理人】

【識別番号】 100093230

【弁理士】

【氏名又は名称】 西澤 利夫

【電話番号】 03-5454-7191

【手続補正 1】

【補正対象書類名】 特許願

【補正対象項目名】 発明者

【補正方法】 変更

【補正の内容】

【発明者】

【住所又は居所】 東京都町田市成瀬台 2-30-13 ファインビレッジ
成瀬台 B 102号

【氏名】 ルカチョビッチ タマッシュ

【発明者】

【住所又は居所】 東京都町田市成瀬台 3-16-21

【氏名】 アスタロッシュ ソルタン

【発明者】

【住所又は居所】 東京都町田市成瀬台 4-18-8

【氏名】 山元 大輔

【発明者】

【住所又は居所】 神奈川県相模原市南台 3-10-12 ファミリーユ 102

【氏名】 栗野 若枝

【提出物件の目録】

【物件名】 誤記理由書 1

29815200943



誤記理由書

本件につきましては、発明者でありますアスタロッシュ ゾルタンの氏名を「アスタロッシュ ゾルダン」と記載致しましたが、これは「アスタロッシュ ゾルタン」の誤りであります。

この誤記は出願時における代理人の確認ミスにより生じたものであります。

よって、発明者でありますアスタロッシュ ゾルタンの氏名を「アスタロッシュ ゾルタン」と訂正致します。

【書類名】 職権訂正データ
【訂正書類】 手続補正書

<認定情報・付加情報>

【補正をする者】
【識別番号】 396020800
【住所又は居所】 埼玉県川口市本町4丁目1番8号
【氏名又は名称】 科学技術振興事業団
【代理人】 申請人
【識別番号】 100093230
【住所又は居所】 東京都渋谷区宇田川町37-10 麻仁ビル6階
西澤国際特許事務所
【氏名又は名称】 西澤 利夫
【提出された物件の記事】
【提出物件名】 誤記理由書 1

【書類名】 職権訂正データ
【訂正書類】 手続補正書

<認定情報・付加情報>

【補正をする者】
【識別番号】 396020800
【住所又は居所】 埼玉県川口市本町4丁目1番8号
【氏名又は名称】 科学技術振興事業団
【代理人】 申請人
【識別番号】 100093230
【住所又は居所】 東京都渋谷区宇田川町37-10 麻仁ビル6階
西澤国際特許事務所
【氏名又は名称】 西澤 利夫

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [396020800]

1. 変更年月日	1998年 2月24日
[変更理由]	名称変更
住 所	埼玉県川口市本町4丁目1番8号
氏 名	科学技術振興事業団

